COLETÂNEA DE TRABALHOS DO INSTITUTO BUTANTAN

THE LIBRARY OF THE
JUN 26 1969
UNIVERSITY OF ILLINOIS

VOL. VIII
(1960 - 1961)

SÃO PAULO - BRASIL
CAIXA POSTAL 65

COLETÂNEA

DE

TRABALHOS DO INSTITUTO BUTANTAN

(Collected Papers from the Instituto Butantan)

VOL. VIII

(1960 - 1961)

*

São Paulo - Brasil
Caixa Postal 65

A "COLETÂNEA DE TRABALHOS DO INSTITUTO BUTANTAN" é destinada à reprodução dos trabalhos realizados no Instituto Butantan, publicados em revistas, livros ou Anais de Congressos não editados pelo Instituto.

É um meio de divulgação no Brasil e no estrangeiro da atividade científica dos pesquisadores do Instituto Butantan, a fim de facilitar o intercâmbio de novos conhecimentos, sem o qual a Ciência não progride.

Separatas dos trabalhos nela contidos devem ser solicitadas diretamente aos autores, dirigindo-se ao:

INSTITUTO BUTANTAN
Caixa Postal, 65
São Paulo — Brasil

PEDE-SE PERMUTA
EXCHANGE DESIRED

COMISSÃO DE REDAÇÃO DAS PUBLICAÇÕES
DO INSTITUTO BUTANTAN

Presidente:

Dr. Gastão Rosenfeld

Membros:

Wolfgang Bücherl

F.ca Eva Maria Antonia Kelen

ÍNDICE

COLETÂNEA — VOLUME VIII

1960-1961

1. AMARAL, J. P. & SOERENSEN, B. — BCG por via oral em cobaios. *Hospital, 58*:1053-1057, 1960.

2. AMORIM, M. F., MELLO, R. F. & SALIBA, F. — Intermediate nephron nephrosis experimentally induced with "Crotalus T. Terrificus" venom in the dog *Rev. Bras. Biol., 20*:359-364, 1960.

3. ARAGÃO, H. & FONSECA, F. da — Notas de Ixodologia. VIII. Lista e chave para os representantes da fauna ixodológica brasileira. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 59*:115-130, 1961.

4. ARAGÃO, H. & FONSECA, F. da — Notas de Ixodologia. IX. O complexo *Ovale* do gênero *Amblyomma*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 59*:131-148, 1961.

5. BEÇAK, W. & BEÇAK, M. L. — Constituição cromossômica de duas espécies de aranhas do gênero "Loxosceles". *Rev. Bras. Biol., 20*:425-427, 1960.

6. BEÇAK, W. — Human chromosomes in short-term cultures from peripheric blood leucocytes. *Rev. Bras. Biol., 21*:281-286, 1961.

7. BEÇAK, W., ANDRADE, J. D. & BEÇAK, M. L. — Short-term culture of leucocytes from monkey peripheral blood. *American Naturalist, 95*:383-384, 1961.

8. BÜCHERL, W. — Die Tarantelspinne *Lycosa erythrognatha* Lucas 1836. *Arzneimittel-Forschung (Drug Research), 10*:774-777, 1960.

9. BÜCHERL, W. — Loxosceles y loxoscelismo en America del Sur. *Bol. Chileno de Parasitologia, 15*:73-77, 1960.

10. BÜCHERL, W. — Aranhas do gênero *Loxosceles* e Loxoscelismo na América. *Ciência e Cultura, 13*:213-224, 1961.

11. FONSECA, F. da — Notes d'acarologie. XLV. Enquête acarologique au Pérou. *Acarologia, 2*:1-34, 1960.

12. HADLER, W. A. & ZITI, L. M. — The effects of 4-4'-diaminodiphenyl selenide, diphenyl sulfone, and 4-4'-diaminodiphenyl in the treatment of murine leprosy. *Internat. J. Leprosy, 29*:191-195, 1961.

13. HADLER, W. A. & ZITI, L. M. — Effect of BCG vaccination upon the evolutive rate of murine leprosy. *Internat. J. Leprosy, 29*:196-199, 1961.

14. HENRIQUES, O. B., FICHMAN, M. & BERALDO, W. T. — Bradykinin-releasing factor from *Bothrops jararaca* venom. *Nature, 187*:414-415, 1960.

15. HENRIQUES, O. B., FICHMAN, M. & HENRIQUES, S. B. — Partial purification and some properties of the blood-clotting factor from the venom of *Bothrops jararaca*. *Biochem. J., 75*:551-556, 1960.

16. HOGE, A. R. & LANCINI, A. R. — Notas sobre la ubicacion de la terra typica de varias especies de "serpentes" colectadas por M. Bauperthuis en la "Cote Ferme" y en la "Province de Venezuela". *Bol. del Museo de Ciencias Naturales*, Caracas, 58-62, 1960.

17. LEON, N., EPPS, D. R., BEÇAK, M. L. & BEÇAK, W. — Discrepancies between bone-marrow and peripheral-blood chromosomal constitution. *Lancet ii*, 880-881, 1961.

18. RANGEL, H. & BIER, O. — Immunoelectrophoretic study of the cross reaction between bovine serum albumin and anti-equine serum albumin. *Anais da Academia Bras. de Ciências, 33*:51-54, 1961.

19. ROSENFELD, G. — Acidentes por animais peçonhentos. Serpentes, aranhas e escorpiões, *in* VERONESI, R. — Doenças infecciosas e parasitárias. *Livraria Luso-Espanhola e Brasileira Ltda.*, S. Paulo, 1960, 2º vol., pp. 1269-1289.

20. ROSENFELD, G. & NAHAS, L. — Absence of activity of estrogen and androgen hormones on the prothrombin complex of dogs treated with dicoumarol. *Acta Physiol. Latinoamer., 11*:135-140, 1961.

21. SCHENBERG, S. — Análise imunológica (microdifusão em gel) de venenos individuais de *Bothrops jararaca. Ciência e Cultura, 13*:225-230, 1961.

COMUNICAÇÕES — RESUMOS PUBLICADOS

22C. AMARAL, J. P. do & CAVENAGHI, U. — Tuberculinas diversas e suas reações. Anais dos XI Congresso Nacional de Tuberculose e VI Congresso Brasileiro de Doenças Torácicas. *Universidade do Rio Grande do Sul,* 1º vol., pp. 397-403, 1961.

23C. CAVENAGHI, U. — Produção e estandardização de tuberculina purificada. Anais dos XI Congresso Nacional de Tuberculose e VI Congresso Brasileiro de Doenças Torácicas. *Universidade do Rio Grande do Sul,* 1º vol., pp. 393-395, 1961.

24C. HENRIQUES, O. B., FICHMAN, M. & OLIVEIRA, M. C. F. de — Nôvo método de separação do enzima coagulante do veneno de *Bothrops jararaca. Ciência e Cultura, 12*:175-176, 1960.

25C. LAVRAS, A. A. C., HENRIQUES, S. B., CAMARGO, E. P. & HENRIQUES, O. B. — Aspectos quantitativos do metabolismo proteico no rato. *Acta Physiologica Latinoamericana, 11*:(Proceedings), 229. 1961.

26C. ROSENFELD, G. — Thrombophilometry, Proceedings of the VIIIth International Congress of Hematology (Tokyo, September 4-10, 1960), Vol. 3. *Pan-Pacific Press,* Tokyo, 1962, pp. 1855-1856.

27C. ROSENFELD, G. — Inhibition of the Shwartzman reaction by antagonists of histamine and serotonin. *Acta Physiologica Latinoamericana, 11*:(Proceedings), 273, 1961.

28C. ROSENFELD, G., MARTINS, L. F. & GRECCHI, R. — Neutralização in vivo da ação anticoagulante da heparina pelo veneno botrópico. *Ciência e Cultura, 13*:200-201, 1961.

29C. ROSENFELD, G., ORSO, J. & WAJNTAL, A. — Tempo de recalcificação em plasma de cavalo, conservado e diluído. *Ciência e Cultura, 13*:201, 1961.

30C. ROSENFELD, G. & RZEPPA, H. — Estudos de hemoglobinas A, S, D e F em duas famílias da raça branca com anemia drepanocítica (falciforme). *Ciência e Cultura, 12*:111, 1960.

31C. SCHENBERG, S. & PEREIRA LIMA, F. A. — Identification of enzyme, in ophidian venoms, responsible for ADP dephosphorylation. *Acta Physiologica Latinoamericana, 11*:(Proceedings), 233-234, 1961.

32C. SCHENBERG, S. & PEREIRA LIMA, F. A. — Estudo comparativo da desfosforação do ADP por venenos ofídicos. *Ciência e Cultura, 13*:187-188, 1961.

33C. SCHENBERG, S. & PEREIRA LIMA, F. A. — Características da ofio-adenosinatrifosfatase dos venenos de *Bothrops jararaca, Crotalus durissus terrificus* e *Bitis gabonica. Ciência e Cultura, 13*:188-189, 1961.

34C. SCHENBERG, S., PEREIRA LIMA, F. A. & ANGELINO, E. — Estudo comparativo da 5-nucleotidase nos venenos de *Bothrops jararaca, Crotalus durissus terrificus* e *Bitis gabonica. Ciência e Cultura, 13*:188, 1961.

35C. SOERENSEN, B. — Mutação induzida na *Serratia marcescens. Rev. Bras. Microbiol., 2*:27, 1960.

Reprinted from: O HOSPITAL, 58: 1053-1057
1960

BCG por via oral em cobaios

JANDYRA PLANET DO AMARAL (*)
e
BRUNO SOERENSEN (**)

I — *Comportamento à reação de tuberculina.*

Apesar da variação dos resultados alcançados nas diferentes escolas dos diversos países, parece estar firmado o conceito de que o BCG é uma das mais importantes medidas preventivas para a tuberculose. Das diferentes vias de vacinação, a via bucal, a mais simples ainda é vista com reservas por várias equipes de experimentadores. O método de Arlindo de Assis tem sido estudado principalmente em estatísticas humanas, trabalhos de difícil interpretação, sendo poucas as experiências em animais de laboratório que focalizam tão importante assunto.

A escola francesa pelos trabalhos de Genez Rieux e colaboradores (1), de L. Nègre e outros (2), assinalam a absorção do BCG pelo cobaio através da barreira intestinal; Calmete, Bouquet e Nègre (3) demonstram que o BCG por via oral confere uma resistência aos bacilos absorvidos por via digestiva parenteral. Recentemente autores soviéticos (4) trabalhando com cobaios, concluem que fortes doses de BCG podem conferir uma resistência à infecção tuberculosa, semelhante à conferida pelo método de escarificação.

Pelo presente trabalho procuramos verificar o efeito do BCG administrado por via oral em cobaios jovens com relação à tuberculina.

Parte experimental

As vacinações em cobaios foram feitas com a vacina BCG preparada em nosso laboratório, a mesma que é distribuida para uso humano.

(*) Médico chefe da Secção de Bacteriologia do Instituto Butantan.
(**) Bolsista do Fundo de Pesquisas do Instituto Butantan.

Foram sempre usadas partidas recentes para as quais as provas de vitalidade apresentaram um índice de 10^{-6}.

Os animais foram cuidadosamente selecionados. Cada cobaia mãe, reagindo negativamente à tuberculina a 1/10, com 2 filhotes recém-nascidos, era separada e enviada ao laboratório; dêstes, um filhote, com mais ou menos 30 dias, e com pêso ao redor de 15 grs., era vacinado pela ingestão de quantidade determinada de BCG e o outro, servindo de contrôle não recebia tratamento algum. Os dois irmãos continuaram com o mesmo tratamento alimentar e higiênico. Desta forma, foram selecionados todos os cobaios vacinados e os contrôles. Tôdas as cobaias mães apresentaram reação de tuberculina negativa a 1/10. Para esta reação foi empregada a tuberculina bruta de Koch, fabricada no Instituto Butantan, que é sempre estandardizada ao padrão internacional. O BCG foi cuidadosamente administrado por meio de uma sonda uretral n.º 8, na porção anterior do esôfago, na quantidade requerida, tendo-se o cuidado de não produzir qualquer escarificação na mucosa do animal.

Trabalhamos numa primeira etapa com 67 animais vacinados e 67 contrôles. Êstes foram divididos em 2 lotes: o primeiro de 23 animais recebeu 2 doses de BCG, a primeira de 20mg., e a segundo, 30 dias após, de 30mg., perfazendo um total de 50mg.

Um segundo lote de 44 animais recebeu uma dose única de 20mg de BCG. Decorridos 40 a 60 dias após a administração do BCG, foram praticadas reações de tuberculina nos animais vacinados e nos contrôles. Trabalhamos sempre com a mesma partida de tuberculina diluída a 1/10. As reações foram observadas durante um período de 48 horas e considerou-se positiva a reação com área mínima de 10mm.

O quadro n.º 1 especifica os resultados.

Verifica-se num exame global que, para os 67 cobaios vacinados aparecem 92,5% de reações positivas em conjunto para os 2 lotes, os que receberam 2 doses (50mg) e uma dose (20mg). Todos os contrôles mostraram reações negativas. Se examinarmos os resultados separadamente, para cada lote de animais vacinados com 50mg., e 20mg., nota-se uma percentagem ligeiramente maior, de 95,6% para os cobaios vacinados com 50mg., em 2 doses, enquanto que, a vacinação em dose única de 20mg., positiva 90,9% dos animais, índice ligeiramente inferior. Todos os contrôles mostraram-se negativos. Êstes resultados nos fazem chegar à conclusão de que a vacina BCG por via oral, interfere nas reações específicas, alergizando o cobaio.

Pudemos verificar ainda, segundo a técnica já descrita, o comportamento de cobaios aos quais foram administradas

QUADRO Nº 1

REAÇÕES DE TUBERCULINA EM COBAIOS QUE RECEBERAM B.C.G. POR VIA ORAL

(50 mg. e 20 mg.)

REAÇÃO DE TUBERCULINA	QUANTIDADE DE B.C.G.		TOTAL DE ANIMAIS	COBAIOS CONTROLES
	2 doses 20 mg. + 30 mg.	1 dose 20 mg.		
POSITIVA	22 95,6 %	40 90,9 %	62 92,5 %	0 0 %
NEGATIVA	1 4,3 %	4 9,09 %	5 7,4 %	67 100 %
TOTAL DE ANIMAIS	23	44	67	67

J. I

doses menores, isto é, de 2mg. e 1mg. da vacina. Os resultados estão coligidos no quadro n.º 2.

QUADRO Nº 2

REAÇÕES DE TUBERCULINA EM COBAIOS QUE RECEBERAM B.C.G. POR VIA ORAL.

(2 mg. e 1 mg.)

REAÇÃO DE TUBERCULINA	QUANTIDADE DE B.C.G. ADMINISTRADO		TOTAL DE ANIMAIS	COBAIOS CONTROLES
	1 DOSE: 2 mg.	1 DOSE: 1 mg.		
POSITIVA	11 66,6 %	5 17,2 %	16 34 %	0 0 %
NEGATIVA	7 39,3 %	24 82,7 %	31 65,9 %	47 100 %
TOTAL DE ANIMAIS	18	29	47	47

J. II

Nota-se claramente a importância da quantidade da vacina administrada. Com uma dose de 2mg temos ainda uma positivação da reação de tuberculina em mais de 50% dos animais, isto é, em 66,6%., enquanto que com 1mg., sòmente 17,2% dos cobaios mostraram-se capazes de reagir à tuberculina, num lote de 29 animais.

Todos os contrôles se comportaram negativamente.

Nossos resultados são bastante elucidativos, especificando a importância da quantidade de germes no aparecimento das reações.

Poderíamos ainda salientar que observamos o comportamento das reações positivas em função do tempo; verificamos que, em 11 cobaios positivos em 40-60 dias e vacinados com 2 doses, depois de 11 meses conservaram-se positivos 90,9%; em 11 cobaios vacinados com 20mg., temos 70,7%.

Parece que o tempo interferiria diminuindo a capacidade alérgica dos animais; ainda neste caso, as doses de vacina parecem exercer influência. Em nossas observações, o tempo ideal para o aparecimento das provas alérgicas é de 30 a 40 dias.

— Do exposto, parece podermos concluir que o BCG por via oral é absorvido, provocando reações específicas alérgicas em cobaios jovens. Estas reações estão sensìvelmente relacionados com a quantidade de BCG administrado.

II — *Verificação do poder vacinante do BCG para a tuberculose experimental do cobaio.*

Continuando nossas observações sôbre o BCG administrado por via oral, procuramos verificar o seu poder protetor para a tuberculose experimental do cobaio.

Para tal fim, em um lote de 64 animais pesando mais ou menos 350g., com reação de tuberculina negativa a 1/10 foi administrado por via oral 100mg. da vacina BCG preparada no Instituto Butantan. Êstes cobaios foram conservados em biotério exclusivo sem contacto com outros animais.

Transcorridos prazos variáveis de 7 a 12 meses depois da vacinação, todos os cobaios foram inoculados por via subcutânea, com 2mg. da amostra H37RV.

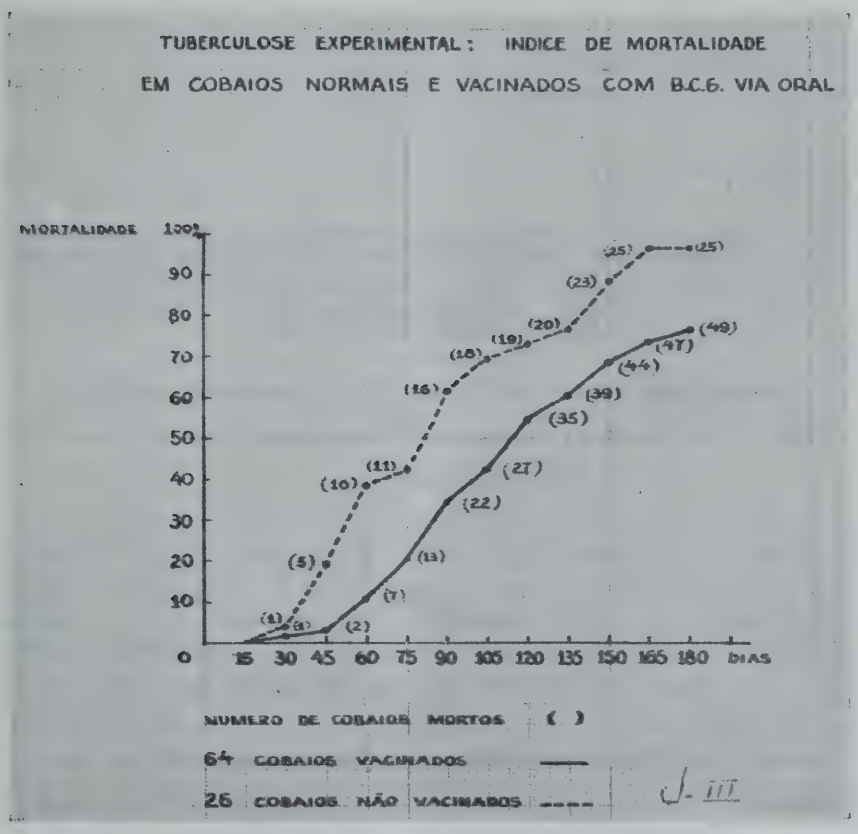
Serviram de contrôle, 26 cobaios normais que receberam sòmente a cultura virulenta.

Os controles e os animais vacinados receberam tratamento absolutamente igual. Foram feitas observações com relação ao tempo da sobrevida dos mesmos.

O gráfico n.º 3 indica os resultados.

Comparando-se o índice de mortalidade dos cobaios tratados pelo BCG e dos controles, vê-se que o tempo de sobrevida dos animais vacinados é maior. Se aplicarmos o cálculo das probabilidades no gráfico em questão, pelo método Fisher exato para tabelas de contingência 2 x 2, chegamos à conclusão de que êste maior tempo de sobrevida para os animais vacinados é estatìsticamente significativo, pois é de 0,02.

Gráfico n.º 3



Destas observações, julgamos poder concluir que, o BCG por via oral possibilita o aumento do tempo de sobrevida na tuberculose experimental do cobaio.

CONCLUSÕES:

1. O BCG por via oral, provoca reações alérgicas específicas que estão sensìvelmente relacionadas com a quantidade de BCG administrado.
2. A vacinação pelo BCG por via oral, aumenta o tempo de sobrevida do cobaio na tuberculose experimental.

BIBLIOGRAFIA:

1. Gernez-Rieux e colab. Ann. Inst. Pasteur Lille, 1953, *6*: 94.
2. Nègre, L. e colab. Ann. Inst. Pasteur, 1960, *98*: 1.
3. Calmette, A. e colab. Ann. Inst. Pasteur, 1921, *35*: 561; 1932, *36*: 625.
   Nègre, L. Ann. Inst. Pasteur, 1935, *54*: 697.
4. Drabkine, R.O. e colab. Prob. Touberk. 1958, *36*: 87.

Agradecemos ao Dr. Adolfo Martins Penha, Diretor de Divisão do Instituto Biológico, a gentileza dos cálculos estatísticos.

Reprinted from: REVISTA BRASILEIRA DE BIOLOGIA, 20 : 359-364, 1960

Rev. Brasil. Biol., 20 (4) : 359-364
Dezembro, 1960 — Rio de Janeiro, GB

INTERMEDIATE NEPHRON NEPHROSIS EXPERIMENTALLY INDUCED WITH "CROTALUS T. TERRIFICUS" VENOM IN THE DOG[1]

MOACYR F. AMORIM, RAUL F. MELLO and FERES SALIBA
Escola Paulista de Medicina, S. Paulo Instituto Butantan S. Paulo

(With 2 text-figures)

Hemoglobinuric nephrosis is not easily produced experimentally in laboratory animals (1). Two synergic factors are necessary: excretion of hemoglobin and a certain degree of tubular lesion. A picture resembling hemoglobinuric nephrosis was procured by means of endovenous injections of concentrated solution of hemoglobin in rabbits whose uriniferous tubes had been previously damaged by a short ischaemia obtained by simple mechanical occlusion of the renal artery by clamping the renal pedicle for periods of 15 to 25 minutes, or also by the subcutaneous injections of a 20% solution of sodium tartrate in a dosage of 0,80 to 0,90 g per kg of body weight (2).

Amorim & Mello (3, 4) demonstrated renal lesions in 3 cases of autopsy of persons bitten by rattlesnake, *Crotalus t. terrificus,* identical to those found in the so-called crush syndrome or hemoglobinuric nephrosis, also denominated nephrosis of the lower nephron (5) or nephrosis of the intermediary nephron (3, 4). This latter denomination was preferred as being more in accordance with the classic nomenclature employed in designating various segments of the nephron (6, 7, 8).

We endeavored to reproduce hemoglobinuric nephrosis experimentally by injecting dogs with rattlesnake venom.

MATERIAL AND METHODS

Seven adult male and one female (N.º 2) dogs whose weight varied from 6 to 14 kg were used in our experiments. We used dried rattlesnake venom, *C. t. terrificus* whose activity, marked by the minimum lethal dose in pigeons

[1] Received for publication September 21, 1960.
This work was partially supported by a grant from the Brazilian National Research Council.

weighing from 250 to 320 g, was from 1 to 2 micrograms. After weighing, the dry poison was dissolved in a physiological solution in a volume of 0,5 to 1,0 cm^3 per kg of body weight, administered by subcutaneous injection. Doses of dry rattlesnake poison injected varied from 0,5 to 2,0 mg per kg of body weight. All doses, except in the case of dogs n.º 9 and 10, which received 3 subcutaneous injections (two 0,5 and one, 1,0 mg per kg of body weight) were administered by means of a single injection.

The benzidine reaction was used to test for free hemoglobin after filtering the urine (9). The LEPEHNE method (10, 11) based on the benzidine reaction was also used to test hemoglobin on histological sections of the kidney. Examination of centrifugalized, unfiltered urine sediment was always made for testing for blood cells.

RESULTS

The results of the experiments are shown in Table I. Duration of observation in the experiments with 8 dogs injected with rattlesnake poison (*C. t. terrificus)* was from 7 hours to a maximum of 9 days and 4 hours (Dogs n.º 3 and n.º 9). Six animals died from crotalic poisoning, 1 dog (n.º 9) was killed with anesthetic ether, and no autopsy was performed on animal n.º 6, since it recuperated completely. Three dogs presented oliguria and 1 animal presented anuria (n.º 5).

Free hemoglobin in the filtered urine, evidenced by the benzidine test, was noted in 6 dogs. Thus, hemoglobinuria was positive in 6 animals. There was no hematuria since the test for blood cells in the sediment of centrifugalized but unfiltered urine was always negative. No blood cells were found within either the uriniferous tubules or in the space of Bowman's capsule on histological sections of the kidney. Hemoglobin casts were found in the uriniferous tubules of histological sections of the kidney of 5 dogs. The simultaneous presence was noted of free hemoglobin in the urine and of hemoglobin casts in the uriniferous tubules on histological sections of the kidney of 4 animals (1, 2, 9 and 10). One dog (n.º 6) on which the benzidine test in the urine was positive 9 hours after poison had been injected, improved noticeably after the fourth day, the benzidine reaction becoming negative upon the animal's rocovery.

The histological lesions of the tubules are principally characterized by degenerative and more serious necrobiotic lesions in the so-called intermediate segment of the nephron, i.e., the ascending branch of Henle's loop and of the distal, or secondary convoluted tubule predominating in the boundary zone of the kidney. The hemoglobin casts or their derivatives (12) may be found within the intermediate zone. They are more numerous in the boundary and medullar zones of the kidney and, in some cases, are apparent from *Cortex corticis* beneath the capsule to the papilla of the kidney.

TABLE I

Effect on the kidney of dogs of subcutaneous injections of Crotalus t. terrificus venom

Observation N.°	Dog N.°	Body weight in kg	Duration of the observation	N.° of injections	Am't of dry poison mg per kg of body weight	Total am't of venom in mg	Volume of physiological solution in ml	Anuria	Oliguria	Hematuria	Hemoglobinuria	Hemoglobin casts in histological sections	Remarks
1	1-♂	12,5	9 hrs. †	1	2,0	25,0	12,5	—	+	—	++	++	† Died from crotalic poisoning
2	2-♀	6,0	28 hrs. †	1	2,0	12,0	6,0	—	—	—	++	+	† Idem
3	3-♂	12,5	7 hrs. †	1	1,0	12,5	12,5	—	+	—	—	+	† Idem
4	4-♂	13,5	17 hrs. †	1	1,0	13,5	13,5	—	+	—	+	—	† Idem
5	5-♂	9,0	11½ hrs. †	1	0,5	4,5	4,5	+	—	—	—	—	† Idem
6	6-♂	8,0	4 days*	1	0,5	4,0	4,0	—	—	—	+	*	* Recuperated. No autopsy performed
7	9-♂	14,0	1 st day 4 th » 6 th » 9 th day, 4 hrs. †	1 1 1 —	0,5 0,5 1,0 —	7,0 7,0 14,0 —	14,0 14,0 14,0 —	— — — —	— — — —	— — — —	— ++ ++ ++	 +	 † Killed with ether
8	10-♂	10,0	1 st day 5 th » 7 th » 7 th day 20 hrs. †	1 1 1 —	0,5 0,5 1,0 —	5,0 5,0 10,0 —	10,0 10,0 10,0 —	— — — —	— — — —	— — — —	++ ++ + +	 +++	 † Died from crotalic poisoning

In 7 out of a group of 8 animals injected with crotalic venom, we were able to reproduce the picture of hemoglobinuric nephrosis demonstrated by the presence of hemoglobin casts or its derivatives in histological sections of kidney, or by hemoglobinuria demonstrated by a positive benzidine test.

DISCUSSION

The histological lesions in the uriniferous tubules of dogs and those of man, described by AMORIM & MELLO (3, 4) in cases of autopsies of persons bitten by rattlesnake, *C. t. terrificus* may be superposed exactly. They are identical and at times present histological pictures of the kidney which in no way differ one from the other as can be seen, comparing fig. 1 of the human kidney (case N.º 2) previously studied by us (3, 4) and fig. 2 of kidney of dog N.º 10.

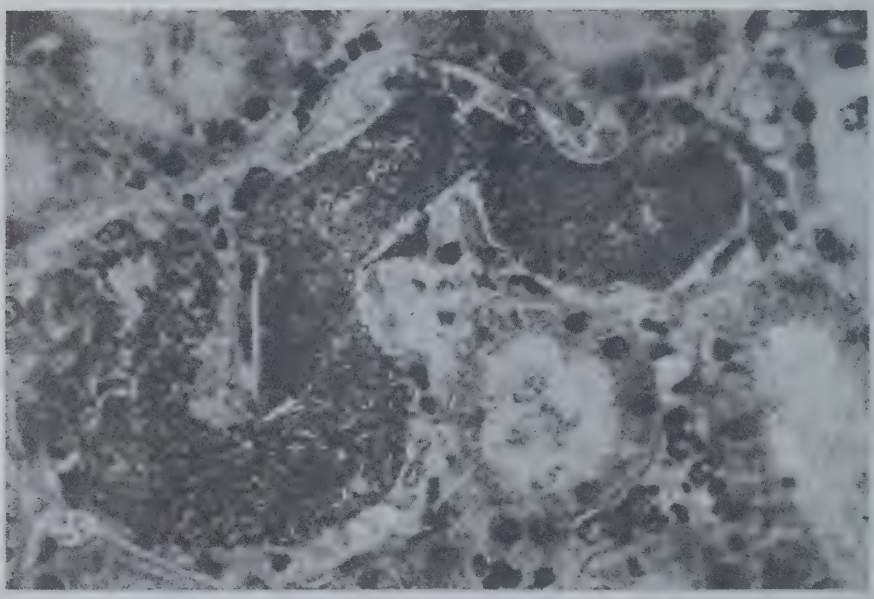


Fig. 1 — Case 2. Human kidney. Distal convoluted tubule with vacuolized cells already partially disappeared (pyknosis and karyorrhexis), entirely filled by granular hemoglobin cast. Surrounding it are convoluted proximal tubules with brush border still perceptible. Hemoglobin and eosin stain. X 495.

Two synergic factors are necessary in experimental reproduction of hemoglobinuric nephrosis: one nephrotoxic and the other hemolytic (1, 2). Our experiments suggest that the venom of *C. t. terrificus* simultaneously contains a nephrotoxic factor which produces a more serious lesion of the renal parenchyma at the level of the intermediate segment of the nephron and of the boundary zone of the kidney, and a hemolytic factor demonstrable by hemoglobinuria or by the presence of hemoglobin casts or their derivatives in the interior of uriniferous tubules in histological sections of the kidney.

More detailed investigation is required as to which of the components of the venom of *Crotalus t. terrificus* are responsible for the nephrotoxic and the hemolytic effect in the dog. This would permit an experimental study of the

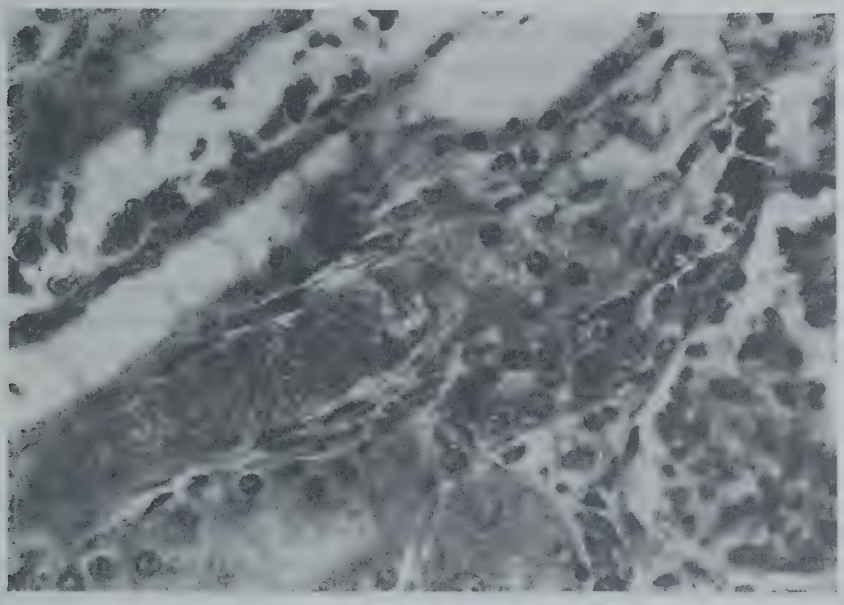


Fig. 2 — Dog. n.° 10. Ascending and descending limbs of Henle's loop near the boundary zone of the kidney. Capillaries filled with blood cells. Note section of a glomerulus. A descending segment of Henle's loop is filled with a granular cast of hemoglobin. Hematoxylin and eosin stain. X 595.

conditions under which hemoglobinuric nephrosis develops, which would be of great interest in pathology and in the investigation of rattlesnake (*C. t. terrificus*) poisoning.

SUMMARY

The venom of *Crotalus terrificus terrificus* injected subcutaneously in 8 dogs whose weight from 6 to 14 kg in quantities from 0,5 to 2,0 mg of dry poison per kg of body weight, induced hemoglobinuric nephrosis or nephrosis of the intermediate nephron in 7 out of 8 dogs as demonstrable by the presence of hemoglobin casts or their derivatives in the interior of uriniferous tubules and by hemoglobinuria. Hemoglobin casts are more numerous in boundary and medullary zones of kidney. No hematuria was found in any animal, and no blood cells were found in uriniferous tubules in histological sections of kidney. Histological lesions of uriniferous tubules of a degenerative and necrobiotic nature are more serious in the so-called intermediate segment of the nephron.

Thus, the venom of *Crotalus t. terrificus* would simultaneously produce a hemolytic and a nephrotoxic effect, prescinding from any other coadjutant and by itself be capable of inducing hemoglobinuric nephrosis in the dog.

RESUMO

O veneno da cascavel (*C. t. terrificus*) injetado por via subcutânea, na quantidade de 0,5 a 2,0 mg de veneno sêco por kg de pêso corporal induziu em 7 cães de um grupo de 8 animais, a nefrose hemoglobinúrica também denominada por nefrose do nefron intermediário, evidenciada pela presença de cilindros de hemoglobina ou de seus derivados no interior dos túbulos uriníferos ou pela hemoglobinúria. Os cilindros de hemoglobina são mais numerosos na zona limitante e medular do rim. As lesões histológicas dos túbulos uriníferos de natureza degenerativa e necrobiótica são mais graves, no chamado segmento intermediário do nefrônio.

Assim, o veneno crotálico possui, simultâneamente, um efeito hemolítico e nefrotóxico e por si só é capaz de produzir a nefrose hemoglobinúrica no cão, prescidindo de qualquer outro agente coadjuvante para isso.

REFERENCES

1. Mallory, T. B., 1947, Hemoglobinuric nephrosis in traumatic shock. *Amer. J. Clin. Pathol.*, 17: 427-443.
2. Yuile, C. L., Gold, M. A. & Hinds, E. G., 1945, Hemoglobin precipitation in renal tubules. *J. Exper. Med.*, 82: 361-374.
3. Amorim, M. F. & Mello, R. F., 1954, Intermediate nephron nephrosis from snake poisoning in man. *Amer. J. Pathol.*, 30: 479-499.
4. Amorim, M. F. & Mello, R. F., 1952, Nefrose do nefron intermediário no envenenamento crotálico humano. *Mem. Inst. Butantan*, 24: 281-316.
5. Lucké, B., 1946, Lower nephron nephrosis. *Mil. Surg.*, 99: 371-396.
6. Costa, A. C. & Chaves, P. R., 1944, *Tratado Elementar de Histologia e Anatomia Microscopica*. 3 ed., Livraria Luso Espanhola. Lisbôa. (cf. vol. 2: 298-304).
7. Policard, A., 1960, *Precis d'Histologie Physiologique*. 5 éd., G. Doin & Cie., Paris, (cf. pp. 530-554).
8. Policard, A., 1908, *Le Tube Urinaire des Mammifères*. Masson & Cie, Paris. (cf. pp. 307-568).
9. Hawk, P. B. & Bergeim, O., 1947, *Practical Physiological Chemistry*. 11th ed., Blakiston Co., Philadelphia, (cf. pp. 437-438).
10. Roulet, F., 1948, *Methoden der Pathologischen Histologie*. Wien-Springer-Verlag. (cf. pp. 242-243).
11. Lepehne, G., 1919, Zerfall der roten Blutkörperchen beim ikterus infektiosus (Weil). *Beitr. Pathol. Anat. allg. Pathol.*, 65: 163-226.
12. Slotta, K., 1955, Chemistry and Biochemistry of Snake Venoms. Progress in the Chemistry of Organic Products. Wien-Springer-Verlag (cf. 12: 406-465).

Separata — Memórias do Instituto Oswaldo Cruz — Tomo 59 — Fascículo 2
Julho de 1961.

Reprinted from:
MEMÓRIAS DO INSTITUTO OSWALDO CRUZ, 59: 115-130, 1961

NOTAS DE IXODOLOGIA. VIII. LISTA E CHAVE PARA OS REPRESENTANTES DA FAUNA IXODOLÓGICA BRASILEIRA*

HENRIQUE ARAGÃO †
Instituto Oswaldo Cruz,
Rio de Janeiro, Guanabara

e

FLAVIO DA FONSECA
Instituto Butantan,
São Paulo

(Com 27 estampas)

As modificações sobrevindas ùltimamente na sistemática de Ixódidas brasileiros, em parte conseqüentes à revisão realizada pelos atuais autores em notas precedentes, tornaram desejável a apresentação de uma lista das espécies válidas do Brasil. Como têm sido, além disso, freqüentes as solicitações recebidas para a confecção de novas chaves taxonômicas, por se ter tornado obsoleta a última, confeccionada por ARAGÃO em 1936, bem como uma sua versão apresentada por PINTO em 1938, a presente nota é também destinada a preencher tal lacuna, pondo em dia a matéria até 1956. Visando o trabalho apenas a fauna brasileira, também a chave genérica fica limitada aos gêneros que ocorrem no Brasil e a alguns outros que tenham probabilidade maior de ser aqui introduzidos, tal como sucedeu recentemente ao gênero *Anocentor*.

Devido às grandes afinidades e à confusão reinante com as espécies *Amblyomma tigrinum* e *Amblyomma triste*, agora revalidadas graças ao trabalho do competente especialista G. M. Kohls, do Rocky Mountain Laboratory, foi incluído nas chaves o *Amblyomma maculatum* Koch, 1844, espécie inexistente no Brasil e originária da América do Norte. As pesquisas de KOHLS demonstraram que *A. maculatum* apenas alcança a Venezuela e a Colômbia e que as referências à sua presença mais ao sul e a leste devem ser substituídas pela de *A. tigrinum*, que é a espécie aqui predominante, a qual passa a ter como sinônimo *A. ovatum* Koch. No nordeste de Mato Grosso, em Jacaré, próximo da foz do rio Coluene, tributário do rio Xingu e na bacia do rio Curuimá, afluente do rio Trombetas, no Estado do Pará, ocorre

* Recebido para publicacão a 13 de outubro de 1960.
† Falecido em 25 de fevereiro de 1956.

ainda a espécie *A. triste*, da qual, além dos dois tipos fêmeas de Koch, que aparentemente foram obtidos em Montevideo, apenas são conhecidos três lotes, um dos quais, com um macho, pertence à coleção do Instituto Oswaldo Cruz.

Amblyomma triste também figurava na sinonímia de *A. maculatum* até ser revalidada no mesmo trabalho de Kohls. A presença de *A. maculatum* em regiões da Venezuela e da Colômbia fronteiriças com o Brasil torna também desejável a sua inclusão nas chaves apresentadas.

É aproveitada a oportunidade para apresentar iconografia a cores dos adultos de muitas espécies, que são aqui documentados pela primeira vez com essa técnica. De muitas delas se conhecem já desenhos de Aragão, de Boero e de Floch & Abonnenc, feitos em prêto e branco. Infelizmente os do primeiro são poucos, os do segundo incluem muitas espécies exóticas e os dos últimos são reproduzidos em papel tão impróprio que os detalhes não podem ser apreciados. Restam os magníficos desenhos em prêto e branco do tratado de Nuttall e as admiráveis pranchas de Koch, estas já com mais de um século!

A rigor não deveria ser feita adição alguma a trabalho realisado em colaboração após o desaparecimento de um dos autores, já que é de ambos a responsabilidade das asserções nêle contidas.

Seria, entretanto, lamentável que na lista de Ixódidas do Brasil ficasse faltando uma espécie encontrada pouco depois de ter sido completado o trabalho de revisão. Serão, portanto, aqui incluídas as observações recentemente feitas por um dos autores em coleção originária da região amazônica, mesmo porque, sendo a adição fàcilmente percebida, o inconveniente acima apontado tem sua importância grandemente diminuída.

A sinonímia apontada por Santos Dias para as espécies *Amblyomma cooperi, A. dissimile* e *A. goeldii,* só vindas à publicação em 1958, serão, pelo mesmo motivo, citadas em notas apensas a essas espécies. *

Os mesmos motivos apontados para a inclusão do *Amblyomma maculatum* nas chaves levaram a nelas colocar o *Amblyomma imitator* Kohls, 1958, espécie muito afim do *A. cajennense,* porém até agora apenas conhecida do México e do sul dos Estados Unidos da América do Norte.

ESTUDO DE PEQUENA COLEÇÃO DO NORTE DO PARÁ

O Prof. Olympio da Fonseca entregou-nos para identificação, em julho de 1957, um lote de interessantes Ixódidas capturados pelo

* Vide J. A. Travassos dos Santos Dias — Notes on various ticks (Acarina-Ixodidae) in collection at some entomological institutes in Paris and London. *An. Inst. Med. Trop.*, 15(2): 459, 1958. O mesmo reparo é válido para a sinonímia de *Amblyomma tasquei* proposta por Floch *in* Ixodides de la Guyane et des Antilles Françaises. *Arch. Inst. Pasteur Guyane Française,* 446: 53, 1958 e para *Haemaphysalis kohlsi* Aragão et Fonseca, 1951.

Dr. Manfred Rauschert e por alguns índios da tribo local, em expedição realizada em 1955-1956 às nascentes do rio Maicuru, tributário da margem esquerda do Amazonas, no norte do Estado do Pará.

Ao lado de espécies já assinaladas no Brasil por Aragão e por Fonseca, permitiu o estudo dêste material acrescentar mais uma à lista das 56 espécies já conhecidas do Brasil. Trata-se do *Amblyomma tasquei* Floch et Abonnenc, 1940, até hoje apenas conhecido pelos exemplares que serviram à descrição, coletados sôbre *Hydrochoerus hydrochoeri* em Saint Tigre, Inini, na Guiana Francesa. De *Amblyomma tasquei* apenas continha o lote em estudo um macho com hipostômio fraturado, o que não impede seja feita a diagnose por se tratar de espécie muito característica, apresentando o macho enormes peritremas, cujo tamanho lembra os de *Amblyomma cooperi,* tendo além disso um espinho interno, pequeno mas nítido, também nas coxas II, III, IV, além do espinho externo maior. Outra particularidade interessante dêste material era a de ter sido colhido sôbre homem, tal como outras duas espécies até agora não assinaladas neste hospedeiro, o *Amblyomma scalpturatum,* o *Amblyomma mantiquirense,* todos em fase adulta. Não tenho dúvida quanto à veracidade da referência a êste hospedeiro em relação à segunda espécie, apanhada sôbre homem, ao lado de *Amblyomma cajennense,* também pelo próprio expedicionário. Quanto ao *A. tasquei* e ao *A. scalpturatum* a informação foi dada sòmente pelos índios que o acompanhavam, o que não seria motivo para dúvidas, as quais sòmente me vieram ao espírito ao ver o hipostômio fraturado na primeira espécie e recoberto de um tecido tão forte na segunda que lembra antes o do paquiderme que habitualmente o hospeda, o *Tapirus terrestris,* do que a pele do homem. Tanto pode ter acontecido que o expedicionário não tivesse entendido a informação dos índios, como que êstes mesmos confundissem material de proveniência humana e de anta, como poderá suceder que o tecido visto envolvendo o hipostômio seja realmente de homem... Aliás, apenas deverão ser aceitas como parasitas acidentais do homem espécies das quais já tenha sido colhido algum exemplar fixado à pele, para que o parasitismo não seja confundido com o simples deambular casual, observado com certa freqüência quando são abatidos animais intensamente parasitados, como os *Tapirus*.

No caso vertente houve ainda outra circunstância que fala a favor da mera contaminação do homem por espécimes provenientes de animais caçados. Refiro-me à existência, no mesmo frasco onde se encontravam os Ixódidas apanhados sôbre homem, de uma fêmea e várias ninfas de um *Sarcoptiformes* da família *Psoralgidae,* de gênero e espécies ainda não descritos. Como há espécie da mesma família parasita de pecari e espécies encontradas sôbre porcos do mato, julgamos provável ser o citado material, pelo menos em parte, da mesma origem.

Pelas notas que acompanhavam o material parece que êste ia sendo colecionado em um mesmo tubo à medida que ia sendo obtido de hospedeiros da mesma espécie.

Os seguintes lotes examinados receberam a numeração da coleção de Ácaros que vem sendo organizada desde mais de 25 anos pelo autor junior;

Lote 5198 — *Amblyomma humerale* Koch, 1844: machos e fêmeas capturados sôbre *Testudo denticulata*.

Lote 5185 — *Amblyomma ovale* Koch, 1844: machos e fêmeas capturados sôbre *Tapirus terrestris*. Como já fôra observado por Aragão & Fonseca, esta espécie apresenta maior robustez quando parasita animais silvestres no norte do Brasil.

Lote 5186 — *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787): um macho e fêmeas sôbre *Tapirus terrestris*. A espécie tem colorido brilhante invulgar quando em parasitismo de animais silvestres.

Lote 5188 — *Amblyomma coelebs* Neumann, 1899: um macho e fêmeas sôbre *Tapirus terrestris*.

Lote 5187 — *Amblyomma scalpturatum* Neumann, 1906: um macho e fêmeas sôbre *Tapirus terrestris*.

Lote 5189 — *Amblyomma oblongoguttatum* Koch, 1844: fêmeas sôbre *Tapirus terrestris*.

Lote 5191 — *Amblyomma ovale* Koch, 1844: um macho sôbre "Porco do mato".

Lote 5192 — *Amblyomma mantiquirense* Aragão, 1908: machos e fêmeas sôbre "Porco do mato". Chama a atenção o desenvolvimento dos tubérculos quitinosos das placas ventrais correspondentes aos festões, os quais são aparentes tanto nos machos como nas fêmeas, tendo nos machos aspecto acuminado muito característico e provàvelmente único no gênero *Amblyomma* (peltae).

Lote 5190 — *Amblyomma oblongoguttatum* Koch, 1844: uma fêmea capturada sôbre "Porco do mato".

Lote s/n — *Amblyomma ovale* Koch, 1844: apanhado sôbre "Onça parda", *Puma concolor*.

Lote 5200 — *Amblyomma ovale* Koch, 1844: numerosos machos e fêmeas de "Onça pintada", *Panthera* (*Jaguarius*) *onca*, carnívoro que apenas parece ser parasitado por esta espécie naquela região.

Lote 5199 — *Amblyomma ovale* Koch, 1844: três machos e uma fêmea capturados sôbre cão. Dois dos machos se apresentavam com tamanho consideràvelmente reduzido, contrastando com o habitual grande desenvolvimento da espécie em animais silvestres.

Lote 5177 — *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787): um macho e fêmeas sôbre cavalo.

Lote 5176 — *Anocentor nitens* (Neumann, 1897): duas fêmeas sôbre cavalo.

Lote 5182 — *Amblyomma tasquei* Floch et Abonnenc, 1940: um macho de hipostômio fraturado, capturado por índios sôbre *Homo*.

Lote 5194 — *Amblyomma mantiquirense* Aragão, 1908: machos capturados sôbre *Homo*.

Lote 5181 — *Amblyomma scalpturatum* Neumann, 1906: machos e fêmeas capturados por índios sôbre *Homo*.

Lote 5193 — *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787): machos e fêmeas capturados sôbre *Homo*.

Lote 5195 — *Amblyomma oblongoguttatum* Koch, 1844: fêmeas capturadas sôbre *Homo*.

As anotações do capturador referem que os carrapatos das onças e dos porcos também atacam o homem, o que não foi possível confirmar em relação aos capturados sôbre as onças, nas quais sòmente foram encontrados *A. ovale* não achados sôbre o homem.

Segundo a observação dos índios da região, referida pelo capturador, as pumas só raramente são parasitadas por ixodídeos, o que não coincide com a nossa verificação no sul do Brasil, onde as temos encontrado parasitadas por *A. ovale e A. aureolatum*.

Registramos agradecimento ao doador do material, Prof. Olympio da Fonseca, do Instituto Oswaldo Cruz e ao seu capturador, Prof. Manfred Rauschert e seus auxiliares índios, graças aos quais fica aumentada de um a lista de Ixodídeos brasileiros e de várias espécies a lista de hospedeiros.

LISTA DAS ESPÉCIES BRASILEIRAS DE IXODÍDEOS

A fauna ixodológica brasileira é constituída por 57 espécies distribuídas por 10 gêneros, a saber: *Argas, Ornithodoros, Otobius, Amblyomma, Anocentor, Boophilus, Haemaphysalis, Ixodes, Rhipicephalus* e *Spelaeorhynchus*.

Dêstes gêneros o dominante é *Amblyomma* com 33 espécies ou cêrca de 58% do total. A seguir vêm os gêneros: *Ixodes* com 9 espécies, *Ornithodoros* com 6, *Haemaphysalis* com 3 e *Argas, Otobius, Rhipicephalus, Boophilus, Anocentor* e *Spelaeorhynchus* com uma espécie cada um.

Lista das espécies assinaladas no Brasil, excluídas as não identificáveis por insuficiência das descrições ou por terem sido consideradas idênticas a outras

Argasidae:

1 — *Argas miniatus* Koch, 1844
2 — *Ornithodoros brasiliensis* Aragão, 1923
3 — *Ornithodoros dunni* Matheson, 1935
4 — *Ornithodoros jul* Schulze, 1940
5 — *Ornithodoros nattereri* Warburton, 1927
6 — *Ornithodoros rostratus* Aragão, 1911
7 — *Ornithodoros talaje* Guérin Méneville, 1849
8 — *Otobius megnini* Dugés, 1844

Ixodidae:

9 — *Amblyomma albopictum* Neumann, 1906
10 — *Amblyomma aureolatum* Pallas, 1772 (=*A. striatum* Koch, 1844)
11 — *Amblyomma auricularium* Conil, 1877
12 — *Amblyomma brasiliense* Aragão, 1908
13 — *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787)
14 — *Amblyomma calcaratum* Neumann, 1899
15 — *Amblyomma coelebs* Neumann, 1899

16 — *Amblyomma cooperi* Nuttall et Warburton, 1908 *
17 — *Amblyomma dissimile* Koch, 1844 **
18 — *Amblyomma fulvum* Neumann, 1899
19 — *Amblyomma fuscum* Neumann, 1899
20 — *Amblyomma geayi* Neumann, 1899
21 — *Amblyomma goeldii* Neumann, 1899 ***
22 — *Amblyomma humerale* Koch, 1844
23 — *Amblyomma incisum* Neumann, 1906
24 — *Amblyomma longirostre* Koch, 1844
25 — *Amblyomma mantiquirense* Aragão, 1908
26 — *Amblyomma multipunctum* Neumann, 1899
27 — *Amblyomma nodosum* Neumann, 1899
28 — *Amblyomma oblongoguttatum* Koch, 1844
29 — *Amblyomma ovale* Koch, 1844 (=*A. fossum* Neumann, 1898)
30 — *Amblyomma pacae* Aragão, 1911
31 — *Amblyomma parkeri* Fonseca et Aragão, 1952
32 — *Amblyomma parvum* Aragão, 1908
33 — *Amblyomma pictum* Neumann, 1905
34 — *Amblyomma pseudoconcolor* Aragão, 1908
35 — *Amblyomma rotundatum* Koch, 1844 (= *A. agamum* Aragão, 1912)
36 — *Amblyomma scalpturatum* Neumann, 1906
37 — *Amblyomma scutatum* Neumann, 1899
38 — *Amblyomma tasquei* Floch et Abonnenc, 1940 ****
39 — *Amblyomma tigrinum* Koch, 1844
40 — *Amblyomma triste* Koch, 1844
41 — *Amblyomma varium* Koch, 1844
42 — *Anocentor nitens* (Neumann, 1897)
43 — *Boophilus microplus* Canestrini, 1890
44 — *Haemaphysalis cinnabarina* Koch, 1844
45 — *Haemaphysalis kohlsi* Aragão et Fonseca, 1951 (= *H. kochi* Aragão, 1908)*****
46 — *Haemaphysalis leporispalustris* Packard, 1869
47 — *Ixodes amarali* Fonseca, 1935
48 — *Ixodes aragaoi* Fonseca, 1935
49 — *Ixodes cooleyi* Aragão et Fonseca, 1954
50 — *Ixodes coxaefurcatus* Neumann, 1899
51 — *Ixodes didelphidis* Fonseca et Aragão, 1951
52 — *Ixodes fuscipes* Koch, 1844
53 — *Ixodes loricatus* Neumann, 1899
54 — *Ixodes luciae* Sennevet, 1935
55 — *Ixodes schulzei* Aragão et Fonseca, 1951
56 — *Rhipicephalus sanguineus* Latreille, 1829

Spelaeorhynchidae:

57 — *Spelaeorhynchus praecursor* Neumann, 1899 (= *S. latus* Banks, 1917)

---

* Segundo Santos Dias, em 1958, esta espécie é sinônima de *Amblyomma lutzi* Aragão, 1908, cujo nome prevalece por ter sido proposto antes.

** Segundo Santos Dias, em 1958, esta espécie é sinônima de *Amblyomma bibroni* (Gervais, 1842), esta, portanto, com prioridade.

*** Segundo Santos Dias, em 1958, esta espécie é sinônima de *Amblyomma fuscomaculatum* (Lucas, 1773), cujo nome havia sido proposto há mais de um século devendo ser o adotado.

**** Segundo Floch & Fauran, em 1958, *A. romitti* Tonelli-Rondelli, 1939 tem prioridade sôbre *A. tasquei* Floch et Abonnenc, 1940, devendo prevalecer o nome dado pela pesquisadora italiana.

***** Segundo Kohls, em 1960, *H. kochi* Aragão, 1908 estava preocupado por *H. concina* var. *kochi* Neumann, 1905. Por outro lado *H. juxtakochi* Cooley, 1946 e *H. kochi* Aragão são idênticos. Deve, portanto, prevalecer para o *H. kochi* Aragão, 1908, o nome *H. juxtakochi* Cooley, 1946.

CHAVES PARA FAMÍLIAS E PARA GÊNEROS E ESPÉCIES DO BRASIL

A apresentação de uma chave diferenciadora dos 52 gêneros e subgêneros de *Ixodides*, 30 dos primeiros e 22 dos últimos, viria complicar demasiado e desnecessàriamente a distinção genérica dos representantes americanos que apenas alcançam cêrca de um têrço dêsse total. Aquêle grande número de subdivisões não é, além disso, aceito ou adotado pela maioria dos sistematas que, ou considera injustificada sua proposta, ou acha que o critério adotado para ereção dessas novas entidades se afasta demais do habitualmente utilizado, como é o caso para vários gêneros de Schulze baseados na morfologia do órgão de Haller. Em conseqüência, julgou o autor junior mais acertado adotar o critério aqui seguido, embora o assunto não tivesse chegado a ser discutido com Aragão, mesmo porque é êste um procedimento mais coerente com a atitude do autor senior, o qual jamais fêz uso de tais entidades sistemáticas nos seus numerosos trabalhos sôbre Ixódidas.

Ordem **Acari**

Sub-ordem **Ixodides**

Chave das famílias para gêneros americanos

1. — Sem epístoma e sem grande cavidade bucal. Fêmea sem placa esternal. Hipostômio saliente e denticulado 2
   — Com epistoma e grande cavidade bucal. Com placa esternal. Hipostômio saliente e inerme. Monotípica e de macho desconhecido. Parasita de morcegos centro e sul-americanos ..... *Spelaeorhynchidae*
2. — Sem escudo dorsal — *Argasidae* 4
   — Com escudo dorsal 3
3. — Escudo dorsal rudimentar, tegumento rugoso lembrando o de Argasideos; monotípica e de macho desconhecido; com uma única espécie africana, *Nutalliella namaqua* ..... *Nutalliellidae*
   — Escudo dorsal bem diferenciado; desdobrada em muitos gêneros e com distribuição geográfica mundial — *Ixodidae* 7
4. — Bordos laterais do corpo com tegumento diferenciado ..... *Argas* Canestrini, 1890
   — Bordos laterais do corpo sem tegumento diferenciado 5
5. — Adultos com hipostômio vestigial; ninfas com tegumento espinhoso ..... *Otobius* Banks, 1912
   — Adultos com hipostômio normal; ninfas com tegumento não espinhoso 6
6. — Hipostômio escavado, convexo na face ventral e côncavo na face dorsal ..... *Antricola* Cooley et Kohls, 1942
   — Hipostômio de conformação variada, mas nunca escavado ..... *Ornithodoros* Karsch, 1847
7. — Sulco anal passando por diante do ânus 8
   — Sulco anal situado atrás do ânus 9
8. — Palpos do macho e da fêmea canaliculados; 3.º artículo dos palpos da fêmea mais longo do que largo e bem separado do 2.º artículo ..... *Ixodes* Latreille, 1795
   — Palpos do macho cônicos; 3.º artículo dos palpos da fêmea muito alargado e pràticamente fundido com o 2.º ..... *Ceratixodes* Neumann, 1902

9. — Rostro curto 10
— Rostro longo 15
10. — Sem olhos ..... *Haemaphysalis* Koch, 1844
— Com olhos 11
11. — Base do capítulo retangular em ambos os sexos; machos sem placas ventrais e com coxa IV maior 12
— Base do capítulo hexagonal em ambos os sexos; machos com placas ventrais e com coxa IV não maior do que as outras 13
12. — Escudo dorsal ornamentado em ambos os sexos; machos com 11 festões ..... *Dermacentor* Koch, 1844
— Escudo dorsal sem ornamentação; machos com 7 festões ..... *Anocentor* Schulze, 1937
13. — Machos com uma placa pré-anal bem visível ..... *Margaropus* Karsch, 1879
— Machos sem placa pré-anal 14
14. — Em ambos os sexos o sulco anal é nítido, o espiráculo apresenta um prolongamento ou colo e a coxa I tem dois espinhos longos; machos de tamanho moderado, com festões e 2 ou 4 placas adanais ..... *Rhipicephalus* Koch, 1844
— Sulco anal ausente nas fêmeas e inconspícuo nos machos; espiráculos redondos e coxa I com dois espinhos curtos em ambos os sexos; machos muito pequenos sem festões e com 4 placas adanais ..... *Boophilus* Curtice, 1891
15. — Com olhos ..... *Amblyomma* Koch, 1844
— Sem olhos ..... *Aponomma* Neumann, 1899

Chaves para determinação das espécies dos diferentes gêneros de Ixodídeos existentes no Brasil

Gênero **Argas**

(Macho e fêmea)

1. — Corpo oblongo com as faces dorsal e ventral bem separadas; retículo quadrangular na margem. Peritrema grande, oval, com cêrca de 27 a 28μ de comprimento por 21 a 23μ de largura ..... *A. miniatus*
(Nota: No *Argas persicus*, inexistente no Brasil, o peritrema é circular com o diâmetro de 15 a 17μ).

Gênero **Ornithodoros**

(Macho e fêmea)

1. — Bochechas ausentes 2
— Bochechas presentes 4
2. — Tarsos e pretarsos com pontas bem desenvolvidas nos 1.º, 2.º e 3.º pares, ausentes no 4.º par 3
— Tarsos e pretarsos com rugosidades e pequenas saliências nos 1.º, 2.º e 3.º pares e uma pequena ponta apical no 4.º par ..... *O. brasiliensis*
3. — Tíbia com prolongamento digitiforme dorsal na metade proximal ..... *O. nattereri*
— Tíbia sem prolongamento digitiforme dorsal ..... *O. rostratus*
4. — Corpo muito anguloso na frente ..... *O. jul*
— Corpo pouco anguloso na frente 5
5. — Bochechas muito desenvolvidas chegando, às vêzes, a cobrir as partes bucais. Coxas I e II separadas ..... *O. talage*
— Bochechas pouco desenvolvidas, tôdas as coxas contíguas ..... *O. dunni*

Gênero **Otobius**

(Macho, fêmea e ninfa)

1. — Corpo mais largo na frente e com ligeira constrição ao nível do 4.º par de patas. Hipostômio pouco desenvolvido no adulto. Corpo das ninfas dilatado na frente, com tegumento muito espinhoso ..... *O. megnini*

Gênero **Ixodes**

(Machos)

1. — Espinho externo da coxa I muito longo, cobrindo todo o artículo seguinte ..... *I. luciae*
   — Espinho externo da coxa I curto não cobrindo todo o artículo seguinte 2
2. — Gnatossoma com ângulos laterais dorsais da base muito arredondados ..... *I. coxaefurcatus*
   — Gnatossoma anguloso na face dorsal 3
3. — Espinhos da coxa I desiguais sendo o interno muito longo e ultrapassando a metade da coxa II. Hipostômio curto e largo, com 2 dentes posteriores extremamente fortes ..... *I. aragaoi*
   — Espinhos da coxa I subiguais não atingindo o meio da coxa II. Hipostômio fino e longo, sem dentes posteriores mais fortes 4
4. — Peritrema em oval irregular, menor e com o máximo de 5 fileiras de pontuações entre a mácula e o bordo na parte mais larga .... *I. loricatus*
   — Peritrema elítico, maior e com o mínimo de 8 fileiras de pontuações entre a mácula e o bordo na parte mais larga ..... *I. didelphidis*

Gênero **Ixodes**

(Fêmeas)

1. — *Cornua* e aurícula presentes 2
   — *Cornua* e aurícula ausentes 3
2. — 1.º artículo dos palpos com prolongamento ventral acentuado dirigido para frente ..... *I. auritulus*
   — 1.º artículo dos palpos sem prolongamento ventral dirigido para frente ..... *I. fuscipes*
3. — Coxa I com 2 espinhos desiguais sendo um dêles longo e agudo, podendo cobrir o artículo seguinte 4
   — Coxa I com 2 espinhos curtos pouco aguçados, podendo um dêles atingir pequena parte do artículo seguinte 5
4. — O espinho mais longo da coxa I é o interno. Escudo regularmente pontuado ..... *I. aragaoi*
   — O espinho mais longo da coxa I é o externo. Escudo com pontuações maiores na porção mediana ..... *I. luciae*
5. — Escudo com bordo anterior reto ou quase reto 6
   — Escudo com bordo anterior chanfrado 7
6. — Escudo com o bordo anterior reto e com algumas pontuações em fila longitudinal no ângulo posterior .....*I. schulzei*
   — Escudo com bordo anterior reto e sem fileira longitudinal e pontuações no ângulo posterior ..... *I. amarali*
7. — Peritremas arredondados com 5 fileiras de fossetas bem isoladas na parte mais larga a contar da área estigmal ..... *I. loricatus*
   — Peritrema elipsóide com 9 fileiras de fossetas aproximadas umas das outras na parte mais larga a contar da área estigmal ..... *I. didelphidis*

Gênero **Haemaphysalis**

(Macho e fêmea)

1. — Hipostômio com 3 fileiras de dentes de cada lado .... *H. leporispalustris*
   — Hipostômio com 4 fileiras de dentes de cada lado 2
2. — 3.º artículo dos palpos com uma ponta retrógrada curta .. *H. cinnaberina*
   — 3.º artículo dos palpos com uma ponta retrógrada longa .....
   ..... *H. kohlsi* (= *H. kochi pro parte*) *

Gênero **Rhipicephalus**

1. — Escudo sem manchas e com 3 fileiras de dentes de cada lado. Peritremas em vírgula. Macho com 2 placas adanais de cada lado, a interna larga e bem conformada e a acessória pouco acentuada, terminada em pequena ponta ..... *R. sanguineus*

Gênero **Boophilus**

(Macho e fêmea)

1. — Escudo sem manchas e sem pontuações. Hipostômio mais longo que os palpos, com 4 a 5 fileiras de dentes de cada lado. Peritremas circulares. Macho com 2 placas adanais longas, bem distintas, de cada lado do corpo terminando posteriormente em ponta curta e aguda ..... *B. microplus*

Gênero **Anocentor**

1. — Escudo sem ornamentação e com 7 festões. Peritremas salientes, ovais, com poucas fossetas bastante grandes. Coxas de tamanho crescente do 1.º ao 4.º pares de patas ..... *A. nitens*

Gênero **Amblyomma**

(Machos)

1. — Sulco marginal distinto, limitando posteriormente todos os festões ....
   2
   — Sulco marginal incompleto ou ausente 13
2. — Coxa I com 2 espinhos agudos e longos, sobretudo o externo que é encurvado na extremidade, ambos cobrindo o artículo seguinte, especialmente o externo. Escudo castanho com faixas estreitas esverdeadas ou côr de cobre. Espécie pequena e escura ..... *A. ovale* (= *A. fossum*)
   — Coxa I com 2 espinhos dos quais um em geral cobre o artículo seguinte ou se ambos o cobrem, não alcançam a metade dêsse artículo
   3
3. — Coxa IV com um espinho mais longo ou quase tão longo quanto o artículo 4
   — Coxa IV com um espinho mais curto que o artículo 7

---

* Segundo Cooley, *H. kohlsi* Aragão et Fonseca, 1951 deve ser substituído por *H. juxtakochi* Cooley, 1946 que não difere da espécie descrita por Aragão em 1908, ao contrário do que supunha Cooley.

4. — Coxa I com 2 espinhos muito desproporcionados, sendo o externo longo e o interno quase obsoleto. Escudo castanho com faixas amarelas. Espécies pequenas 5
— Coxa I com 2 espinhos desiguais, mas não de tamanho muito desproporcionado. Escudo castanho com faixas esbranquiçadas ou côr de cobre que dão à região anterior o aspecto de um pseudo-escudo fêmea. Espécie de tamanho variando de pequeno a médio ..... *A. cajennense* *
5. — Pretarsos 2, 3 e 4 com 2 espinhos paralelos ..... *A. maculatum*
— Pretarsos 2, 3 e 4 com um só espinho 6
6. — Festões com tubérculos quitinosos (peltae) ..... *A. triste*
— Festões sem tubérculos quitinosos (peltae) ..... *A. tigrinum*
7. — 1.º artículo dos palpos sem saliência ventral. Escudo, alargado para trás, de côr castanha com faixas esverdeadas. Espécie grande .....*A. geayi*
— 1.º artículo dos palpos com saliência ventral 8
8. — Escudo sem manchas, de colorido castanho. Espécie muito pequena ..... *A. parvum*
— Escudo com manchas 9
9. — Espinhos da coxa I iguais 10
— Espinhos da coxa I desiguais ou subiguais, curtos e separados 11
10. — Coxa I com 2 espinhos iguais e um tanto fortes. Escudo castanho escuro com manchas, dando à região anterior o aspecto de um pseudo-escudo fêmea. Espécie de tamanho médio ..... *A. coelebs*
— Coxa I com 2 espinhos iguais, mas fracos e pouco longos. Escudo castanho claro com manchas esbranquiçadas nas porções laterais. Espécie pequena ..... *A. oblongoguttatum*
11. — Escudo castanho claro com manchas esbranquiçadas. Peritremas ovais muito largos. Espécie de tamanho médio ..... *A. cooperi* **
— Escudo castanho escuro. Peritremas em vírgula 12
12. — Escudo castanho avermelhado com algumas manchas amareladas nos lados. Pontuações numerosas por tôda a superfície do escudo. Espécie muito pequena ..... *A. auricularium*
— Escudo castanho escuro com várias manchas amareladas próximas da margem. Pontuações pouco numerosas sobretudo na porção mediana do escudo. Espécie pequena ..... *A. pseudoconcolor*
13. — Sulco marginal incompleto 14
— Sulco marginal ausente 18
14. — Base do gnatossoma largamente hexagonal. Escudo castanho escuro com faixas esverdeadas ou amareladas. Espécie grande, estreita e escura ..... *A. longirostre*
— Base do gnatossoma quadrangular 15
15. — Coxa I com 2 espinhos longos quase iguais, cobrindo o artículo seguinte, sobretudo o externo. Escudo de fundo castanho claro, predominando o colorido amarelado. Espécie pequena, oval estreitada e clara ..... *A. aureolatum* (= *A. striatum*)
— Coxa I com 2 espinhos muito mais curtos e desiguais, cobrindo só pequena parte do artículo seguinte 16
16. — Só a coxa I com 2 espinhos, tendo as restantes um só espinho. Escudo castanho escuro com manchas. Festões prolongados por lâminas quitinosas (*peltae*) largas não incisadas. Espécie robusta e de tamanho médio ..... *A. scalpturatum*
— Tôdas as coxas com 2 espinhos 17

---

* No México e no sul dos Estados Unidos da América do Norte também o *A. imitator* Kohls, 1958.

** Segundo Santos Dias, em 1958, o *Amblyomma lutzi* Aragão, 1908 precede de mais de um mês a descrição do *A. cooperi* por Nutall & Warburton, devendo, pois, prevalecer o nome proposto por Aragão.

17. — Hipostômio com fórmula 4/4. Peritrema de grande desenvolvimento. Festões não prolongados por lâminas quitinosas salientes. Espécie pequena ..... *A. tasquei* *
— Coxa I com 2 espinhos, os 2.º e 3.º pares com 2 pequenos tubérculos, o interno mais conspícuo e o do 4.º par com espinho externo longo e um interno reduzido a um pequeno tubérculo. Hipostômio com fórmula 3/3. Peritrema de tamanho normal. Escudo castanho claro com manchas amareladas. Festões prolongados por lâminas quitinosas (*peltae*) salientes não incisadas. Espécie pequena ..... *A. brasiliense*
18. — Coxa IV com um só espinho 19
— Coxa IV com 2 espinhos 30
19. — Coxa I com um só espinho ..... *A. albopictum*
— Coxa I com 2 espinhos 20
20. — Hipostômio com 3 fileiras de dentes de cada lado 21
— Hipostômio com 4 fileiras de dentes de cada lado 28
21. — Coxa II com 2 espinhos. Espécie pequena ..... *A. scutatum*
— Coxa II com um só espinho 22
22. — Coxa IV com um espinho mais curto que o artículo 23
— Coxa IV com um espinho tão longo quanto o artículo. Espécie de tamanho médio ..... *A. calcaratum*
23. — Festões com prolongamentos quitinosos incisados. Espécie de tamanho médio ..... *A. incisum*
— Festões sem prolongamentos quitinosos incisados 24
24. — Espécies de grandes dimensões, com idiossoma de mais de 0,5 cm 25
— Espécies de pequenas dimensões, com idiossoma de menos de 0,5 cm .. 26
25. — Escudo dorsal de côr castanha quase preta com desenhos esverdeados. Espécie grande e muito alargada ..... *A. varium*
— Escudo dorsal de colorido pardo amarelado desenhando-se na região anterior um pseudo-escudo fêmea. Espécie grande e alongada .... *A. pictum*
26. — Palpos muito nodosos. Escudo de colorido castanho com manchas douradas que na porção ântero-lateral apresentam o aspecto de um "Y". Espécie de tamanho médio ..... *A. nodosum*
— Palpos não nodosos 27
27. — Escudo plano, castanho, com colorido amarelado ou acobreado, com numerosas pontuações largas e superficiais. Face ventral com tubérculos mamiliformes correspondendo ao bordo interno dos festões, exceto o primeiro e o mediano, visíveis mesmo ao exame pela face dorsal, tal como nas fêmeas. Espécie pequena ..... *A. mantiquirense*
— Escudo abaulado, castanho, com algumas manchas pouco distintas e numerosas pontuações finas regularmente distribuídas. Espécie pequena ..... *A. pacae*
28. — Escudo castanho escuro sem manchas e com pequena elevação arredondada submediana. Espécie pequena ..... *A. goeldii* **
— Escudo castanho sem pequena elevação arredondada submediana ... 29
29. — Escudo plano, castanho acinzentado, claro, com orla amarelada e pontuações pouco abundantes grandes e profundas quase ausentes na porção mediana. Coxa IV com espinho curto. Espécie larga e de tamanho médio ..... *A. fuscum*
— Escudo castanho escuro, com manchas acobreadas e numerosas pontuações grandes e aproximadas. Coxa IV com espinho muito longo. Espécie de tamanho grande..... *A. multipunctum*

---

* Segundo Floch & Fauran, em 1958, *A. romitii* Tonelli-Rondelli, 1939 tem prioridade sôbre *A. tasquei* Floch et Abonnenc, 1940.

** Segundo Santos Dias (1958) os exemplares existentes no Museu de Paris e considerados tipos do *Amblyomma fuscomaculatum* (Lucas, 1873) são, na opinião de Neumann, que assim os rotulou, e na sua própria, idênticos ao *A. goeldii* Neumann, 1899, devendo prevalecer, portanto, a denominação proposta por Lucas.

30. — Escudo castanho com manchas amareladas ou acobreadas predominantes, que na porção anterior tomam o aspecto de um pseudo-escudo fêmea. Pontuações numerosas muito grandes, entremeadas de outras menores, tanto umas como outras irregularmente distribuídas. Espécie de tamanho médio. Espinho interno da coxa IV às vêzes ausente .... *A. dissimile* *
— Espécie de tamanho pouco acima do médio. Escudo castanho quase prêto com manchas acobreadas, às vêzes pouco visíveis, salvo duas manchas lineares situadas nas zonas escapulares, características da espécie. Pontuações numerosas não muito grandes espalhadas pelo escudo .... *A. humerale*

Gênero **Amblyomma**

(Fêmea)

1. — Coxa IV com um só espinho 2
— Coxa IV com 2 espinhos, em geral curtos 29
2. — Hipostômio espatulado. Escudo subtriangular ou cordiforme 3
— Hipostômio lanceolado. Escudo alongado, quase losângico, de côr castanha com manchas esverdeadas na porção mediana. Espécie de tamanho médio antes de sugar e muito grande grande quando cheia .... *A. longirostre*
3. — Hipostômio com 3 fileiras de dentes 4
— Hipostômio com 4 ou 5 fileiras de dentes 25
4. — Coxa I com 2 espinhos maiores que o comprimento do artículo 5
— Coxa I com 2 espinhos dos quais um pelo menos mais curto que o comprimento do artículo 6
5. — Coxa I com 2 espinhos muito longos sendo o externo terminado em ponta aguda e ligeiramente encurvada. Pontuações do escudo profundas, um tanto desiguais e desigualmente distribuídas. Manchas esverdeadas ou acobreadas deixando ver áreas escuras um tanto extensas. Espécie de tamanho médio ..... *A. ovale* (= *A. fossum*)
— Coxa I com 2 espinhos muito longos, subiguais, o externo não encurvado. Pontuações do escudo profundas, iguais e mais regularmente distribuídas por todo êle. Escudo pràticamente todo amarelado ou côr de cobre. Espécie de tamanho médio ..... *A. aureolatum* (= *A. striatum*)
6. — Coxa I com 2 espinhos muito desiguais sendo um tão longo que atinge o artículo seguinte e o outro quase obsoleto 7
— Coxa I com 2 espinhos iguais ou desiguais mas não muito desproporcionados 9
7. — Pretarsos 2, 3 e 4 com 2 espinhos paralelos ..... *A. maculatum*
— Pretarsos 2, 3 e 4 com um só espinho 8
8. — Festões com tubérculos nos ângulos póstero-internos ..... *A. triste*
— Festões sem tubérculos nos ângulos póstero-internos ..... *A. tigrinum*
9. — Escudo castanho com ou sem manchas e com pontuações superficiais ou um tanto profundas, iguais ou desiguais, mais ou menos regularmente distribuídas. Sem tubérculos mamiliformes nos festões, com exceção de *cajennense* 10
— Escudo com bordos castanhos e centro amarelo ou acobreado com pontuações largas e superficiais especialmente numerosas nas porções laterais, pontuações essas entremeadas de outras finas mais abundantes na porção posterior. Festões com tubérculos mamiliformes sal entes no ângulo interno ..... *A. mantiquirense*

---

* Em 1958 Santos Dias exprime a opinião de que o *Amblyomma dissimile* Koch, 1844 nada mais é do que *A. bibroni* (Gervais, 1842), nome êste que deverá prevalecer.

10. — Escudo com vestígios de depressões laterais, cordiforme e de bordos sinuosos 11
— Escudo sem vestígios de depressões laterais e quando cordiformes os bordos são sinuosos 12
11. — Escudo castanho avermelhado com raras manchas amareladas situadas lateralmente. Espécie pequena ..... *A. auricularium*
— Escudo castanho pardo, com várias manchas amareladas sobretudo nas porções laterais. Espécie pequena ..... *A. pseudoconcolor*
12. — Escudo subtriangular 13
— Escudo cordiforme 19
13. — 1.º artículo dos palpos com saliência ventral 14
— 1.º artículo dos palpos sem saliência ventral 16
14. — Escudo dorsal geralmente sem manchas ou com manchas muito discretas. Face ventral com pêlos. Espécie muito pequena ..... *A. parvum*
— Escudo dorsal com manchas conspícuas 15
15. — Mancha esbranquiçada central do escudo interrompida na porção mediana posterior por uma faixa escura longitudinal. Peritremas de forma oval larga. Espécie de tamanho médio ..... *A. cooperi* *
— Mancha esbranquiçada central do escudo reduzida a pequena área posterior, não interrompida na região mediana. Espécie pequena. ..... *A. oblongoguttatum*
16. — Escudo castanho com manchas pouco aparentes nos lados e na porção anterior. Pontuações finas muito numerosas, regularmente distribuídas. Espécie pequena ..... *A. pacae*
— Escudo com manchas bem aparentes, brancas ou acobreadas. Pontuações de tamanho médio irregularmente distribuídas 17
17. — Ápice dos festões com pequeno tubérculo no ângulo interno; sem projeção mais escura que o tegumento em situação póstero-lateral no orifício genital 18
— Ápice dos festões sem tal tubérculo; projeção romba mais escura que o tegumento, de situação póstero-lateral e fazendo saliência para dentro do orifício genital ..... *A. imitator* **
18. — Escudo castanho escuro com manchas esbranquiçadas ou acobreadas não interrompidas na porção média posterior. Ápice dos festões com um pequeno tubérculo quitinoso no ângulo interno. Face dorsal pilosa. Espécie muito freqüente e de tamanho médio ..... *A. cajennense*
— Escudo castanho claro com ângulo posterior largo, e algumas manchas acobreadas pouco densas irregulares no centro e nos lados. Olhos situados no nível do meio do escudo. Espécie muito rara e de tamanho médio ..... *A. parkeri*
19. — Base do gnatossoma quadrangular 20
— Base do gnatossoma subtriangular ou trapezoidal 23
20. — Escudo amarelo pálido ou com manchas pardas 21
— Escudo castanho escuro com manchas esbranquiçadas ou acobreadas 22
21. — Escudo amarelo sujo. Espécie muito grande ..... *A. pictum*
— Escudo com manchas pardas. Espécie pequena ..... *A. scutatum*
22. — Fossetas cervicais longas, em "S". Espécie de tamanho médio .... *A. coelebs*
— Fossetas cervicais sob a forma de depressões curtas. Espécie de tamanho médio ..... *A. nodosum*
23. — Escudo pardo vermelho ou pardo marron 24
— Escudo quase prêto com manchas esverdeadas. Espécie grande, sendo enormes as fêmeas quando repletas ..... *A. varium*

---

* Ver nota feita a propósito do macho desta espécie.

** Muito próximo de *cajennense* mas só ocorrendo no sul dos Estados Unidos e México.

24. — *Cornua* saliente. Espécie de tamanho médio. ..... *A. calcaratum*
— *Cornua* pouco pronunciado. Espécie grande, com idiossoma de mais de 0,5 cm na fêmea jejuna ..... *A. geayi*
25. — Hipostômio com 4 fileiras de dentes 26
— Hipostômio com 5 fileiras de dentes. Espécie de tamanho acima do médio ..... *A. multipunctum*
26. — Escudo castanho escuro com manchas esbranquiçadas ou acobreadas, externas 27
— Escudo castanho claro sem manchas 28
27. — Escudo com manchas esbranquiçadas ou acobreadas tomando quase tôda a superfície. Ápice dos festões com um pequeno tubérculo quitinoso no ângulo interno. Espécie de tamanho médio ..... *A. incisum*
— Escudo com uma mancha esbranquiçada ou acobreada no ângulo posterior. Ápice dos festões com tubérculos quitinosos largos e pouco salientes no ângulo interno. Espécie robusta, de tamanho médio .... *A. scalpturatum*
28. — Escudo castanho brilhante com numerosas pontuações pequenas e iguais. Espécie pequena ..... *A. goeldii* *
— Escudo castanho fosco com cêrca de 30 pontuações finas, umas e outras mais numerosas nas porções laterais. Espécie de tamanho médio .... *A. fuscum*
29. — Base do gnatossoma com ângulos póstero-laterais salientes 30
— Base do gnatossoma com ângulos póstero-laterais não salientes 31
30. — Escudo subtriangular com ângulos escapulares paralelos aos bordos. Tubérculos quitinosos no ângulo interno do ápice dos festões. Espécie pequena ..... *A. brasiliense*
— Escudo subtriangular, com duas manchas escapulares e alongadas, paralelas aos bordos. Ápice dos festões sem tubérculos quitinosos no ângulo interno. Espécie de tamanho acima do médio ..... *A. humerale*
31. — Hipostômio com fórmula 4/4 ..... *A. tasquei* **
— Hipostômio sem fórmula 3/3 32
32. — Escudo com cêrca de 12 pontuações muito grandes e profundas na porção antero-lateral, entremeadas de outras menores, que também existem na região média. Espécie de tamanho médio a pequeno. Espinhos das coxas pontudos ..... *A. dissimile* ***
— Escudo com pontuações médias e pequenas mais numerosas nas porções laterais anteriores. Espécie de tamanho médio. Espinhos das coxas rombos ..... *A. rotundatum*

---

* Leia-se a nota existente na chave para os machos, a propósito desta espécie.

** Sôbre a sinonímia para êste nome veja-se o referido em nota na chave para os machos.

*** Sôbre a sinonímia para êste nome veja-se o referido em nota na chave para os machos.

ESTAMPA 1

Argas miniatus Koch, 1844, fêmea, faces dorsal e ventral. Carlos A. Silva *del*.

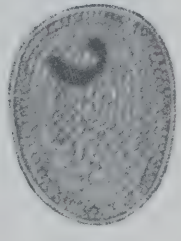
Mem. Inst. Oswaldo Cruz,
59(2): 115-130 — Jul., 1961

ARAGÃO & FONSECA: Notas de Ixodologia. VIII.

ESTAMPA 2

Ornithodoros rostratus Aragão, 1911, fêmea, faces dorsal e ventral e peritrema muito aumentado. Carlos A. Silva *del.*

Mem. Inst. Oswaldo Cruz,
59(2): 115-130 — Jul., 1961

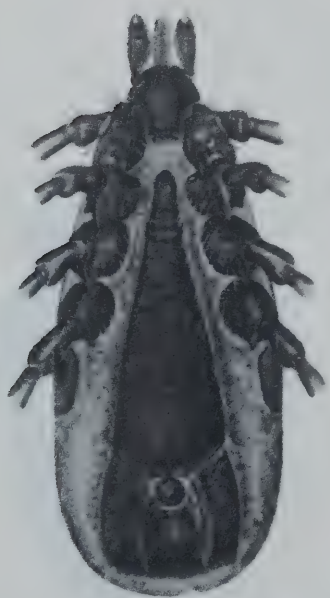


ARAGÃO & FONSECA: Notas de Ixodologia. VIII.

ESTAMPA 3

Ixodes loricatus Neumann, 1899, macho, faces dorsal e ventral. Carlos A. Silva *del.*

Mem. Inst. Oswaldo Cruz,
59(2): 115-130 — Jul., 1961



ARAGÃO & FONSECA: Notas de Ixodologia. VIII.

ESTAMPA 4

Ixodes loricatus Neumann, 1899, fêmea, faces dorsal e ventral. Carlos A. Silva *del.*

Mem. Inst. Oswaldo Cruz.
59(2): 115-130 — Jul., 1961

ARAGÃO & FONSECA: Notas de Ixodologia. VIII.

ESTAMPA 5

Ixodes lorivatus Neumann, 1899 (ao alto) e *Ixodes schulzei* Aragão et Fonseca, 1951 (em baixo), fêmea repleta. Carlos A. Silva *del*.

Mem. Inst. Oswaldo Cruz,
59(2): 115-130 — Jul., 1961

ARAGÃO & FONSECA: Notas de Ixodologia. VIII.

ESTAMPA 6

Ixodes luciae Senevet, 1935, macho, faces dorsal e ventral. Carlos A. Silva *del*.

Recebemos

We have received

ann

Coletânea

Instituto Butantan

ano 1960/61 Vol. 8

500

University of Illinois -Library-
Exchange Division
U R B A N A, Illinois

U.S.A.

Pede-se permuta - Exchange desired

Data / /

Please correct your adress

I M P R E S S O S

Instituto Butantan

Biblioteca

Caixa Postal, 65

São Paulo

BRASIL

ARAGAO & FONSECA: Notas de Ixodologia. VIII.

ESTAMPA 7

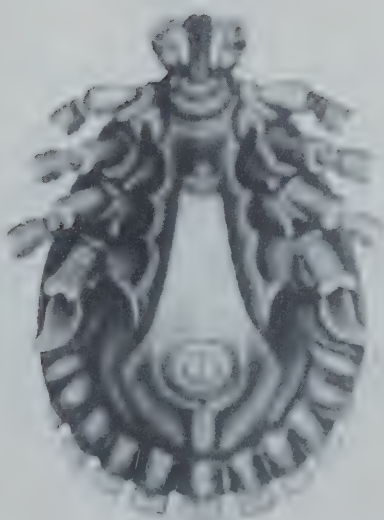
Ixodes luciae Senevet, 1935, fêmea, faces dorsal e ventral. Carlos A. Silva *del*.

Mem. Inst. Oswaldo Cruz,
59(2): 115-130 — Jul., 1961

ARAGÃO & FONSECA: Notas de Ixodologia. VIII.

ESTAMPA 8

Amblyomma brasiliense Aragão, 1908, macho, faces dorsal e ventral. **Carlos A. Silva** *del*.



ARAGÃO & FONSECA: Notas de Ixodologia. VIII.

ESTAMPA 9

Amblyomma brasiliense Aragão, 1908, fêmea, faces dorsal e ventral. Carlos A. Silva *del*.

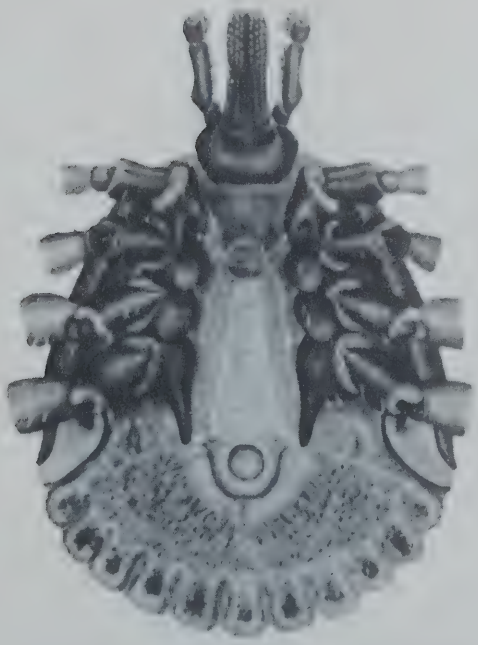
Mem. Inst. Oswaldo Cruz,
59(2): 115-130 — Jul., 1961

ARAGÃO & FONSECA: Notas de Ixodologia. VIII.

ESTAMPA 10

Amblyomma cajennense (Fabricius, 1787), macho, faces dorsal e ventral. Carlos A. Silva *del*.

Mem. Inst. Oswaldo Cruz,
59(2): 115-130 — Jul., 1961



ARAGÃO & FONSECA: Notas de Ixodologia. VIII.

ESTAMPA 11

Amblyomma cajennense (Fabricius, 1787), fêmea, faces dorsal e ventral. **Carlos A. Silva** *del*.

Mem. Inst. Oswaldo Cruz,
59(2): 115-130 — Jul., 1961

ARAGÃO & FONSECA: Notas de Ixodologia. VIII.

ESTAMPA 12

Amblyomma calcaratum Neumann, 1899, macho, faces dorsal e ventral. **Carlos A. Silva** *del*.

Mem. Inst. Oswaldo Cruz,
59(2): 115-130 — Jul., 1961

ARAGÃO & FONSECA: Notas de Ixodologia. VIII.

ESTAMPA 13

Amblyomma calcaratum Neumann, 1899, fêmea, faces dorsal e ventral. **Carlos A. Silva** *del*.

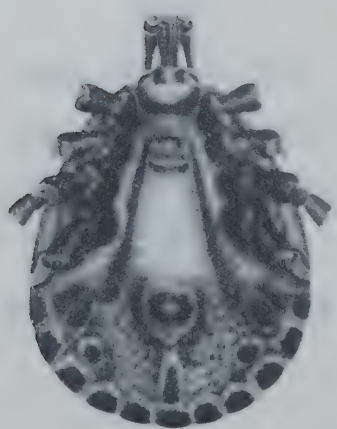
Mem. Inst. Oswaldo Cruz,
59(2): 115-130 — Jul., 1961

ARAGÃO & FONSECA: Notas de Ixodologia. VIII.

ESTAMPA 14

Amblyomma geayi Neumann, 1899, macho, faces dorsal e ventral. **Carlos A. Silva** *del*.

Mem. Inst. Oswaldo Cruz,
59(2): 115-130 — Jul., 1961



ARAGÃO & FONSECA: Notas de Ixodologia. VIII.

ESTAMPA 15

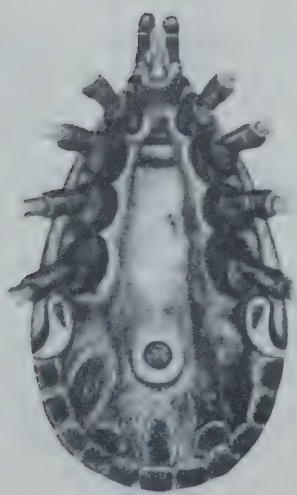
Amblyomma geayi Neumann, 1899, fêmea, faces dorsal e ventral. **Carlos A.** Silva *del*

Mem. Inst. Oswaldo Cruz,
59(2): 115-130 — Jul., 1961

ARAGÃO & FONSECA: Notas de Ixodologia. VIII.

ESTAMPA 16

Amblyomma longirostre Koch, 1844, macho, faces dorsal e ventral. **Carlos A Silva** *del*.



ARAGÃO & FONSECA: Notas de Ixodologia. VIII.

ESTAMPA 17

Amblyomma longirostre Koch, 1844. fêmea, faces dorsal e ventral. **Carlos A. Silva** *del*.

Mem. Inst. Oswaldo Cruz.
59(2): 115-130 — Jul., 1961

ARAGÃO & FONSECA: Notas de Ixodologia. VIII.

ESTAMPA 19

Amblyomma nodosum Neumann, 1899, fêmea, faces dorsal e ventral. **Carlos A.** Silva *del*.

Mem. Inst. Oswaldo Cruz,
59(2): 115-130 — Jul., 1961

ARAGÃO & FONSECA: Notas de Ixodologia. VIII.

ESTAMPA 20

Amblyomma oblongoguttatum Koch, 1844, macho, faces dorsal e ventral. **Carlos A. Silva** *del*.

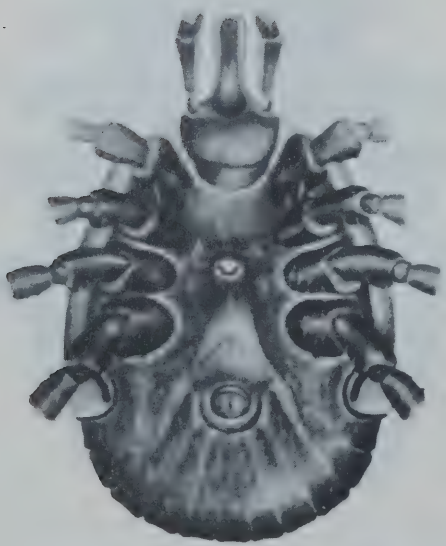
Mem. Inst. Oswaldo Cruz.
59(2): 115-130 — Jul., 1961

ARAGÃO & FONSECA: Notas de Ixodologia. VIII.

ESTAMPA 21

Amblyomma oblongoguttatum Koch, 1844, fêmea, faces dorsol e ventral. Carlos A. Silva *del*.

Mem. Inst. Oswaldo Cruz,
59(2): 115-130 — Jul., 1961

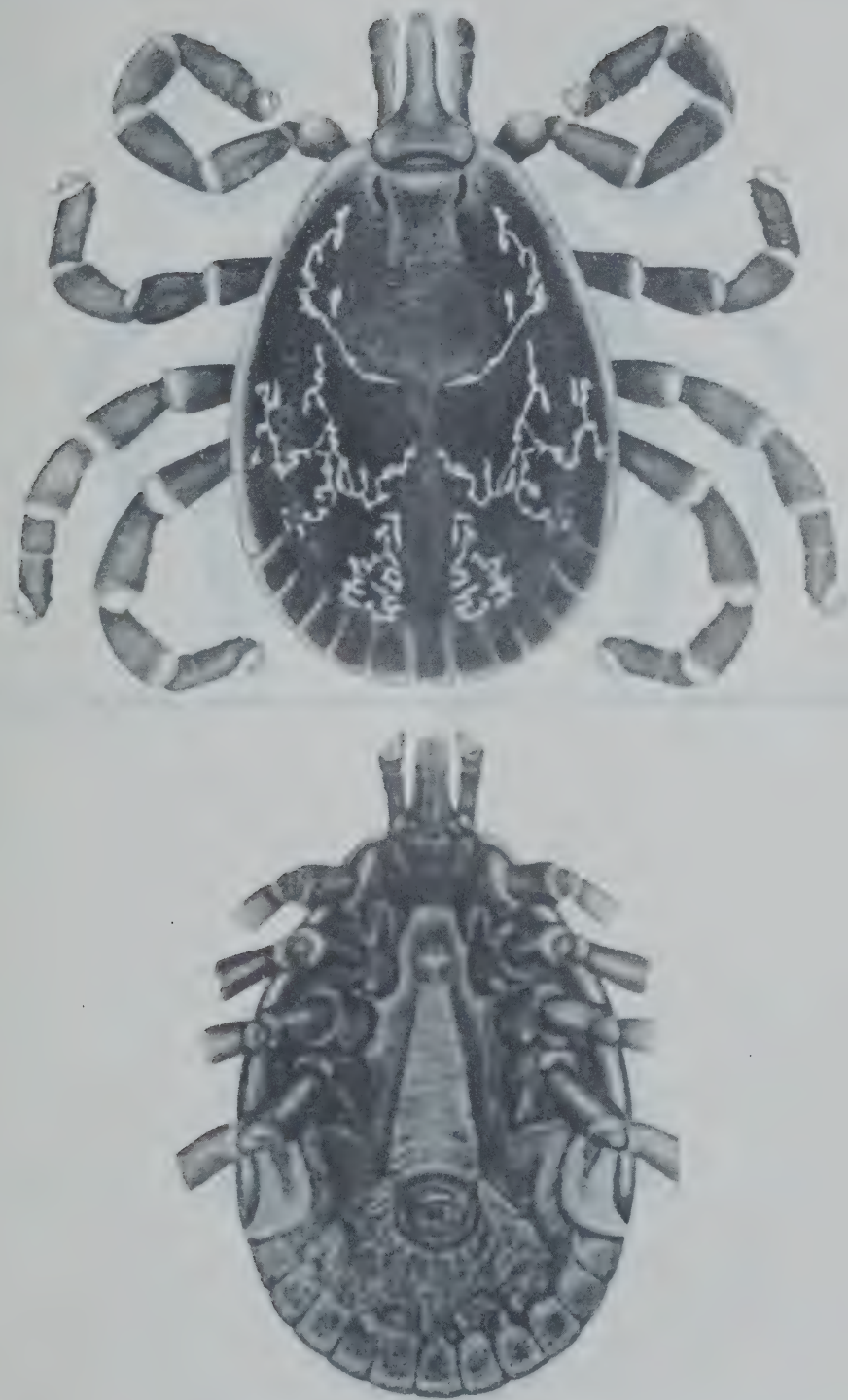


ARAGÃO & FONSECA: Notas de Ixodologia. VIII.

ESTAMPA 22

Amblyomma pacae Aragão, 1911, macho, faces dorsal e ventral. Carlos A. Silva *del*.

Mem. Inst. Oswaldo Cruz,
59(2): 115-130 — Jul., 1961



ARAGÃO & FONSECA: Notas de Ixodologia. VIII.

ESTAMPA 23

Amblyomma pacae Aragão, 1911, fêmea, faces dorsal e ventral. Carlos A. Silva *del.*

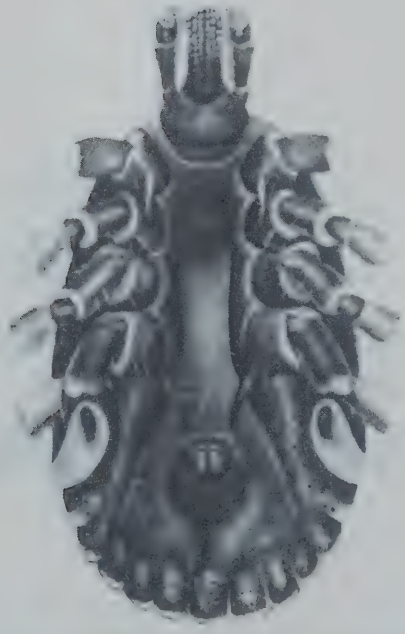
Mem. Inst. Oswaldo Cruz,
59(2): 115-130 — Jul., 1961

ARAGÃO & FONSECA: Notas de Ixodologia. VIII.

ESTAMPA 24

Amblyomma tigrinum Koch, 1844, macho, faces dorsal e ventral. Carlos A. Silva *del*.

Mem. Inst. Oswaldo Cruz,
59(2): 115-130 — Jul., 1961

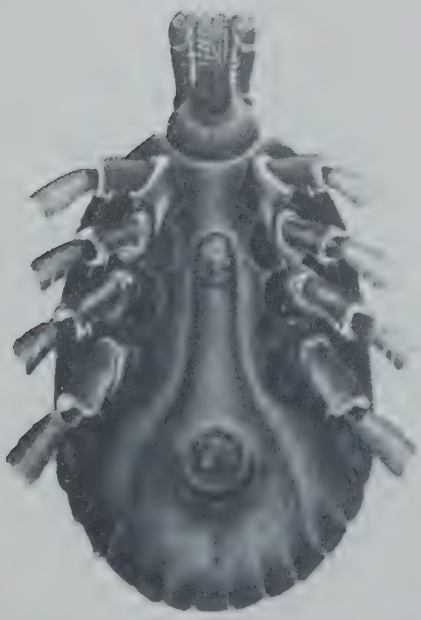


ARAGÃO & FONSECA: Notas de Ixodologia. VIII.

ESTAMPA 25

Amblyomma tigrinum Koch, 1844, fêmea, faces dorsal e ventral. **Carlos A.** Silva *del*.

Mem. Inst. Oswaldo Cruz,
59(2): 115-130 — Jul., 1961

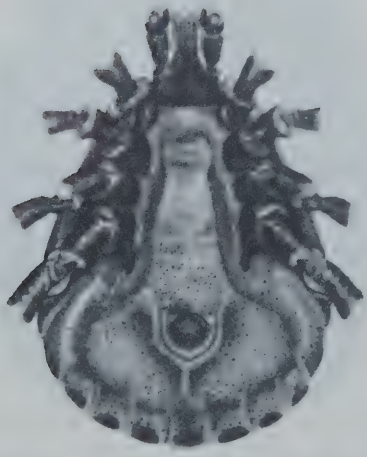


ARAGÃO & FONSECA: Notas de Ixodologia. VIII.

ESTAMPA 26

Amblyomma varium Koch, 1844, macho, faces dorsal e ventral. Carlos A. Silva *del.*

Mem. Inst. Oswaldo Cruz.
59(2): 115-130 — Jul., 1961



ARAGÃO & FONSECA: Notas de Ixodologia. VIII.

ESTAMPA 27

Amblyomma varium Koch, 1844, fêmea, faces dorsal e ventral. Carlos **A. Silva** ***del***.

ARAGÃO & FONSECA: Notas de Ixodologia. VIII.

Separata — Memórias do Instituto Oswaldo Cruz — Tomo 59 — Fascículo 2
Julho de 1961.

Reprinted from:

MEMÓRIAS DO INSTITUTO OSWALDO CRUZ, 59: 131-148, 1961

NOTAS DE IXODOLOGIA. IX. O COMPLEXO *OVALE* DO GÊNERO *AMBLYOMMA**

HENRIQUE ARAGÃO †
Instituto Oswaldo Cruz,
Rio de Janeiro, Guanabara

e

FLAVIO DA FONSECA
Instituto Butantan,
São Paulo

(Com 4 estampas)

No seu trabalho fundamental de 1844, que marca o início do estudo aprofundado e sistematisado dos *Ixodidae,* apresentou Koch a descrição de duas espécies do gênero *Amblyomma* que ainda hoje são objeto de dúvida e discussão: *Amblyomma ovale* Koch, 1844 e *Amblyomma striatum* Koch, 1844. Destas espécies descreveu os machos, apresentando na Monografia de 1847 os desenhos coloridos, tão admiráveis para a época. De *A. ovale* dispôs de três machos do México e de *A. striatum* teria, aparentemente, um só exemplar do Brasil, referindo todavia Neumann ter visto na coleção de Koch quatro machos de *ovale* e um macho e uma fêmea de *striatum.*

Nos mesmos dois trabalhos descreveu as fêmeas de *Amblyomma oblongum* Koch, 1844 e de *Amblyomma confine* Koch, 1844, a primeira descrita de dois e a segunda de um exemplar, ambos do Brasil, a primeira correspondendo ao *A. striatum* Koch, 1844 e a segunda ao *A. fossum* Neumann, 1898, segundo são compreendidas atualmente estas duas espécies.

Em 1888 Berlese descreveu do Rio Apa, Paraguai, a espécie *Amblyomma auronitens* Berlese, 1888, capturada livre, que Neumann e Robinson colocaram na sinonímia de *A. ovale* Koch, 1844, a qual apresenta os mesmos caracteres de *A. fossum* Neumann, segundo o depreendemos da ilustração e da sucinta descrição do trabalho onde é descrita a espécie, sendo o seu *Amblyomma complanatum* Berlese, 1888, também capturado livre, em Mato Grosso, Brasil, publicado no mesmo trabalho, idêntico a *A. maculatum* Koch, 1844, como já o havia assinalado Robinson na Monografia de Nutall, o qual corresponderia, na accepção moderna, ao *A.tigrinum* Koch, 1844.

---

* Recebido para publicação a 13 de outubro de 1960.
† Falecido em 25 de fevereiro de 1956.

Em 1898 NEUMANN, na sua revisão dos *Ixodidae* do mundo, que constitui a mais substancial adição ao trabalho pioneiro de KOCH, sem reconhecer que o pesquisador germânico ao descrever o seu *Amblyomma confina* já havia referido e dado nome à espécie desde 1844, propõe a nova espécie *Amblyomma fossum* Neumann, 1898, de exemplares machos e fêmeas provenientes da Costa Rica e de um macho de Buenos Aires. Não cuidou o grande ixodologista francês de distinguir desde logo a sua espécie da mais afim, o *Amblyomma striatum* Koch, 1844, embora esta não faltasse na magnífica coleção que organizou. Entretanto, o mesmo NEUMANN, em sua 4.ª Memória, diz ser *ovale*, cujo tipo de KOCH examinou, muito próxima do *striatum* e distinta desta apenas pelo colorido e pela nitidez do sulco marginal. Tal qual o seu *A. fossum*. No mesmo trabalho colocou NEUMANN na sinonímia do *A. striatum* as duas espécies de KOCH, *A. oblongum* e *A. confine*, a primeira com razão, representando a segunda um sinônimo de *A. ovale*, tal como *A. fossum*.

ARAGÃO, em 1911, ao rever a fauna brasileira de *Ixodidae*, admite como boas espécies o *A. striatum* e o *A. fossum* Neumann.

ROBINSON, ao rever em 1926, em trabalho que fêz época, a fauna mundial de *Ixodidae*, em parte por deficiência de material e em parte por convicção, assumiu atitude prudentemente conservadora, admitindo a validade de uma única espécie com o caráter excepcional dos dois espinhos muito longos na coxa I, escolhendo a primeira das citadas por KOCH, *ovale*. Colocou, pois, em sinonímia de *ovale* as três restantes espécies de KOCH, mais o *A. fossum* de NEUMANN e, coerentemente com o seu critério, também o *A. auronitens* de BERLESE. É de se acentuar, todavia, o mérito de ROBINSON ao reconhecer como do grupo *ovale* quase tôdas as espécies a êle pertencentes e mascaradas com outras denominações, apenas lhe tendo escapado a espécie de PALLAS, que só mesmo conhecedores aprofundados de bibliografia antiga, como o eram NEUMANN e OUDEMANS, seriam capazes de arrancar do esquecimento.

Em 1935 FONSECA estuda o ciclo evolutivo de *A. striatum* assinalando a constância do principal caráter distintivo, representado pela ausência do sulco marginal no escudo do macho, revalidando esta espécie de KOCH.

Em 1936 ARAGÃO confirma o seu ponto de vista já expresso em 1911, quando opinava pela validade de *A. fossum* e de *A. striatum*.

Em 1937 TONELLI RONDELLI, dispondo de material neotrópico, resolve, escrupulosamente, compará-lo com os machos tipos de KOCH referentes às espécies *ovale* e *striatum*, tendo prestado o grande serviço de redescrevê-los e desenhá-los, trabalho pelo qual lhe devem ser gratos todos que se interessarem por êsse importante grupo de Ixódidas. Os poucos lotes com que trabalhou a pesquisadora italiana, que aliás não teve ocasião de examinar o *A. fossum* de NEUMANN, não lhe permitiram reconhecer que a morfologia das duas únicas espécies de que consta o grupo é passível de certa variação. Em conseqüência dessa falha, não só admitiu a validade das espécies *A. ovale* e *A. striatum* de KOCH e *A. fossum* de NEUMANN, como ainda descreveu, no mesmo grupo,

uma outra espécie que considerou nova, o *Amblyomma quasistriatum* Tonelli Rondelli, 1937.

Não parou entretanto aí a odisséia da sistemática do grupo *ovale*. Paul Schulze, indubitàvelmente o mais profundo conhecedor da morfologia e da fisiologia dos *Ixodidae*, chama à baila, em 1941, o trabalho de Pallas, de 1772, desentranhado do esquecimento por Oudemans, que considerava *A. aureolatum* Pallas, 1772 idêntico ao *A. ovale* Koch, 1844. Ao discutir êsse trabalho, Schulze descreve exemplares de *Amblyomma aureolatum* Pallas, 1772 capturados em Teresópolis, Estado do Rio de Janeiro. Ora, êsses exemplares coincidem perfeitamente com o *Amblyomma striatum* Koch, 1844, impedindo, todavia, a natural deficiência de material neotrópico, que êsse grande conhecedor dos *Ixodidae* fôsse desde logo categórico e colocasse a espécie de Koch na sinonímia da de Pallas, o que não fêz, embora passasse a utilizar o nome dado por Pallas para o material brasileiro que estudou, como sucede no trabalho, também de 1941, em que realiza minucioso estudo comparado do órgão de Haller nos *Ixodides*.

Quem, todavia, como os atuais autores, dispõe de abundante material sul-americano, representado por dezenas de lotes, adquire a convicção de que na fauna neotrópica não existe outra espécie passível de confusão com a de Koch, a qual, apesar de tão antiga, deverá pois, inesperadamente, ser posta na sinonímia da de Pallas, que sôbre ela tem prioridade de 70 anos, já que o material que servira à descrição apresentada por Pallas tinha como proveniência o Brasil.

Ainda nesse ano de 1941, o mesmo sistemata Paul Schulze, cuja coleção extensíssima não devia, entretanto, ser tão rica de exemplares da mesma espécie que lhe permitisse sempre apreciar e dar valor à variação intra específica, pondo demasiado pêso em pequenas alterações observadas em um lote, do que se convencionava chamar *Amblyomma fossum*, cai na armadilha do grupo *ovale* e cria a nova subespécie *A. ovale krieg* Schulze, 1941, baseada a diferença subespecífica no contôrno mais estreitado do macho, no espinho menos encurvado da coxa IV e em pequenas diferenças de pontuações, constando o seu material de 12 machos e 1 fêmea capturados sôbre um cachorro do mato, "Azarafuchs", de Lapongo, Gran Chaco Argentino, a 100 km de Assunção, capital do Paraguai. Com tão pequenas diferenças em um só lote, não pode evidentemente prevalecer tal subespécie, que está dentro do limite de variação específica.

De modo inverso procederam os sistematas sul-americanos, os quais dispondo de número de lotes suficientes, puderam desde logo reconhecer no grupo apenas duas verdadeiras espécies, não dando valor demasiado a meras variações locais, nem despresando os caracteres já fixados pela especiação.

Restava, todavia, ainda reconhecer as características do antigo *A. ovale* de Koch em confronto com *A. fossum* de Neumann. Robinson já havia considerado a segunda mero sinônimo da primeira, porém sem examinar material mexicano outro, além dos tipos de Koch. A

Tonelli Rondelli pareceram as duas espécies diferentes e assim as desenhou. É possível agora aos autores desta nota dirimir a dúvida, baseados no exame de dois lotes do México (N.os 23 776 e 23 777) respectivamente de *Nasua narica* e de *Mazama sartori*, além de mais 8 lotes capturados sôbre cão, homem e outros hospedeiros, na Guatemala, Nicarágua, Costa Rica e Panamá, todos da coleção do Rocky Mountain Laboratory, enviados por gentileza do Dr. G. M. Kohls. Todos os exemplares, machos e fêmeas, coincidem exatamente com a espécie até aqui identificada na América do Sul como *A. fossum*. Não resta, pois, mais dúvida alguma de estar certo Robinson ao afirmar ser o *A. fossum* sinônimo de *A. ovale*.

As divergências de opinião que se verificam com os *Amblyomma* do grupo *ovale* entre os pesquisadores europeus e os nacionais devem ser atribuídas, portanto, à pobreza de material neotrópico com que trabalham os naturalistas do velho mundo.

Na presente nota que prossegue a revisão dos *Ixodidae* neotrópicos, o ponto de vista dualista é novamente confirmado à luz de material abundante, constituído por numerosos lotes das coleções dos autores, sendo determinadas as duas espécies válidas e organizada a seguinte lista de sinônimos.

Amblyomma ovale Koch, 1844

A. confine Koch, 1844
A. auronitens Berlese, 1888
A. fossum Neumann, 1899
A. quasistriatum Tonelli Rondelli, 1937
A. ovale krieg Schulze, 1941

Amblyomma aureolatum (Pallas, 1772)

Acarus aureolatus Fabricius, 1794, *pro parte*
Amblyomma aureolatum (Fabricius, 1794), *pro parte*
A. striatum Koch, 1844
A. oblongum Koch, 1844
A. ovale Koch, 1844, *pro parte*

Passadas em revista as espécies do complexo *ovale* e reconduzidas à posição sistemática que, segundo a interpretação dos atuais autores, elas devem assumir, passaremos à redescrição das duas espécies remanescentes, frisando as variações observadas, as quais virão explicar a situação confusa a que, cada vez mais, êsse pequeno grupamento era levado pelos que, verificando pequenas alterações da morfologia das duas espécies, as interpretavam como outras tantas formas derivadas de especiação, por não disporem de material abundante e de suficiente experiência no estudo do grupo.

Caracteres Gerais e Diferenciais

Amblyomma ovale é, no Brasil, espécie de hábitos nìtidamente silvestres, muito raramente encontrada próximo de cidades, nelas podendo, entretanto, parasitar o cão, mòrmente animal caçador. Por essa particularidade etológica distingue-se da espécie mais próxima e com ela não raro confundida, o *Amblyomma aureolatum* Pallas, de que é sinônimo o *A. striatum* Koch, o qual parasita habitualmente o cão nas cidades do interior e não longe de centros populosos, sendo também freqüentemente encontrado sôbre animais silvestres das mesmas regiões. Até hoje não o encontramos, nem temos conhecimento do registro desta espécie nos mesmos animais nos sertões ou em quaisquer zonas de população humana muito escassa.

Os exemplares de *A. ovale* provenientes de animais silvestres, principalmente de *Tapirus americanus*, do centro-oeste e do norte do Brasil são com freqüência nìtidamente mais robustos do que os do sul. Variações de forma do peritrema podem ser observadas nesta espécie até em machos do mesmo lote, dizendo respeito sobretudo à maior largura ou ao ângulo póstero-interno, que às vêzes é mais acentuado do que na generalidade dos casos.

As duas espécies citadas distinguem-se com certa facilidade pelos caracteres que passamos a apontar. Macho e fêmea com espinho externo da coxa I de ápice mais fino e levemente recurvado para fora em *A. ovale*, ao passo que em *A. aureolatum* o mesmo espinho tem a ponta reta. Coloração do fundo, tanto no escudo quanto na área, de côr castanha escura ou chocolate em *A. ovale*, sendo em *A. aureolatum* o escudo de fundo mais claro e o tegumento descoberto freqüentemente de côr cremosa acinzentada. No desenho dourado do escudo do macho, em *A. ovale*, predominam os traços finos, que vistos a ôlho nu ou com muito pequeno aumento dão, na metade anterior do escudo, a impressão de desenho de uma lira e atrás desta parecem traços de escrita ideográfica oriental; já em *A. aureolatum*, ao contrário, a côr amarelada e não dourada, é extensiva, salientando-se, ao inverso do que se dá em *A. ovale*, as áreas limitadas de côr castanha correspondem às inserções musculares. Nos machos, o sulco marginal é nítido e profundo em *ovale*, atingindo à frente o intervalo das patas II e III, circundando os festões; nos machos de *aureolatum* resta em geral apenas um vestígio do sulco marginal na altura dos peritremas, às vêzes prolongado à frente até o nível da inserção do 3.º par de patas e atrás até o 1.º festão. As fóveas de *ovale*, por ficarem em fundo escuro, são difìcilmente perceptíveis no macho, sendo ao contrário, de grande nitidez em *aureolatum* por contrastarem com a coloração amarela predominante. O escudo das fêmeas de *ovale* apresenta, quando a coloração côr de cobre está bem conservada, desenho claro lembrando uma flor de liz, enquanto em *aureolatum* o escudo é quase todo dourado, sempre que o colorido permanece intacto. Nas fêmeas de *ovale* o ângulo posterior do escudo é quase desprovido de pontuações, apenas sendo observadas 2 a 10 pon-

tuações, das quais algumas geralmente no bordo do ângulo e em *aureolatum* tais pontuações são mais numerosas. Em *ovale* podem ser encontrados machos, de lotes capturados em animais silvestres, com robustez excepcional, o que não acontece em *aureolatum*. Os machos de *ovale* apresentam a face ventral dos festões mais desenvolvida, raramente deixando de apresentar êsse carater, sendo os festões, em cêrca de 50% dos lotes, prolongados ventralmente, tal como em *Amblyomma brasiliense* Aragão, 1908 e em *A. scalpturatum* Neumann, 1906, aspecto êsse raramente observado em *aureolatum*. A postura de *aureolatum* é de côr muito clara, amarela pálida, com aspecto de areia de rio, ao passo que na de *ovale* os ovos são muito escuros.

As variações mais acentuadas observadas na espécie *Amblyomma ovale*, que poderiam ser interpretadas como determinadas por diferenças específicas, por pesquisadores que apenas dispusessem de poucos lotes, dizem respeito sobretudo à invulgar robustez de alguns lotes; à diversidade de conformação do peritrema dos machos, o qual, habitualmente estreito, pode, raramente apresentar-se alargado, com aspecto aproximado do peritrema das fêmeas; às pontuações às vêzes mais abundantes, especialmente ao nível do ângulo posterior do escudo das fêmeas; à falta de afilamento e encurvamento do espinho externo da coxa I; à curvatura atenuada do espinho da coxa IV e à presença de sulcos cervicais longos e aprofundados em certas fêmeas.

Redescrição do **Amblyomma ovale** Koch, 1844

MACHO

Vista a ôlho nu, a face dorsal dos machos tem côr de chocolate brilhante, interrompida por desenho delicado de traço dourado e fino; raras vêzes é desprovida de desenho dourado e tem colorido geral castanho claro, êste último aspecto sòmente observado em exemplares robustos do Brasil Central conservados sêcos. A forma é oval com a extremidade anterior do escudo nìtidamente estreitada; nos exemplares excepcionalmente robustos a extremidade posterior do escudo é proporcionalmente mais larga.

Dimensão total dos machos oscilando entre 4,4 mm a 5,2 mm, chegando a atingir, nos exemplares mais robustos do Brasil Central, 6,0 mm. Um exemplar de um lote do Panamá, ao contrário, media apenas 3,8 mm.

Idiossoma

Escudo dorsal. De forma ovóide estreitada, às vêzes com a região posterior alargada e, nas formas euândricas, com a zona anterior alargada devido à existência de ombros mais pronunciados; ligeiramente abaulado, com sulco marginal muito nítido e profundo, atingindo à frente o intervalo entre as patas II e III, nêle freqüentemente se acumulando as pontuações. As dimensões do escudo oscilam entre 3,5

milímetros de comprimento por 2,3 mm na maior largura até 4,1 por 2,5, e nos exemplares muito robustos do Brasil Central, 4,7 por 3,2. Fossetas cervicais estreitas, profundas e quase retas, mais largas nos exemplares robustos; sulcos cervicais ausentes. Olhos amarelos, pequenos, menores que os da fêmea, mas sempre nítidos. Pequena depressão na porção anterior da inserção muscular longitudinal, mais pronunciada nos exemplares euândricos. Ombros em geral acentuados, menos nítidos nos exemplares menores e nos mais robustos, nestes devido à maior convexidade do ângulo escapular. Pontuações de tamanho médio e pequeno, em geral profundas, mais abundantes ao nível da área posterior do sulco marginal e mais raras no têrço mediano da mancha clara e anterior, ocorrendo também abundantemente sôbre os festões e na faixa externa do sulco marginal. Nunca foram vistas tão esparsas quanto no desenho de Tonelli Rondelli para o *A. ovale* e o *A. fossum*, em seu trabalho de 1937 concordando com a descrição de Schulze para o seu *A. ovale krieg*. Festões mais longos do que largos, convexos, pontuados, manchados, de face ventral freqüentemente prolongada e visível pela face dorsal, mesmo em exemplares pouco robustos, porém nunca apresentando entalhe, podendo tais prolongamentos faltar, embora exista sempre a quitinização ventral.

Ornamentação abundante, constituída por finos traços, que à vista desarmada são dourados e vistos ao microscópio são acobreados, com reflexos esverdeados. A ôlho nu aparecem duas manchas lineares situadas entre as fossetas cervicais e os olhos, atingindo o meio do escudo e com a forma de dois "S" com pequeno prolongamento posterior, limitando uma área que lembra um pseudo-escudo fêmea; para dentro dêsse desenho, entre as fossetas cervicais e não ultrapassando o limite posterior das manchas precedentemente descritas, encontra-se um desenho em ânfora lembrando o desenho mediano do escudo da fêmea, porém menor e sòmente representando o contôrno, com o centro escuro; no seu conjunto êsses dois grupos de manchas formam, quando o macho é examinado a ôlho nu ou com pequeno aumento, o desenho de uma lira. Do meio do escudo para trás vêem-se dois traços finos longitudinais e paramedianos que quase atingem os festões, limitados na frente por um traço semi-circular dividido por dois pequenos traços oblíquos, à frente dos quais fica um outro traço mediano, curto e transversal, que vai encontrar linhas apagadas que partem dos traços prémedianos. No seu conjunto o desenho da metade posterior lembra um símbolo de escrita ideográfica. Visto o escudo ao microscópio tais manchas, entretanto, se mostram mais irregulares, observando-se além das descritas também uma mancha externa estreita, que acompanha de ambos os lados o sulco marginal na zona que fica logo à frente dos festões; êstes apresentam as bases manchadas, podendo tais manchas, de regra mais acentuadas nos festões medianos, ocupar quase tôda a superfície.

Face ventral. De coloração de regra castanha escura, às vêzes ocrácea ou mesmo cremosa. Pêlos esparsos, amarelados, mais abundan-

tes para fora dos sulcos genitais. Pontuações confluentes, rasas, de tamanho médio. Orifício genital sempre ao nível das coxas II, recoberto por placa de bordo posterior destacado. Orifício anal circular, com debrum de quitina mais largo na frente. Sulco anal com prolongamentos na direção dos sulcos genitais. Sulco ano-marginal menos nítido do que os outros. Sulcos genitais nítidos, prolongados até os festões. Peritrema de superfície côr pérola, relativamente estreito, de ângulo póstero-interno muito pouco pronunciado e de colo aberto, pouco nítido, portanto. Debrum estreito com espessamento dorsal externo quase imperceptível. Mácula curta, situada no polo anterior e de disposição ântero-posterior, ligeiramente alargada na extremidade mais anterior. Em certos lotes ou mesmo em lotes com peritrema de forma normal, alguns exemplares apresentam peritrema muito mais alargado e com ângulo póstero-interno mais pronunciado, a tal ponto que chegam a parecer espécie diversa. Interpretamos tais variações de forma do peritrema como um ginotropismo sem significação em sistemática, por nós observado tanto em material do Brasil como no da América Central. Placas ventrais dos festões bem desenvolvidas, destacadas e, em cêrca de 50% dos lotes, prolongadas e perfeitamente aparentes quando o exame é feito pela face dorsal. Em alguns lotes, entretanto, tais placas, embora diferenciadas, não apresentam desenvolvimento maior.

Patas. Robustas; às vêzes ainda mais fortes do que o habitual. Coxa I com dois espinhos extremamente longos, maiores do que em qualquer outra espécie do gênero, igualadas em tamanho só pelas do *A. aureolatum*; o espinho interno é mais largo, de ponta mais romba e sempre ligeiramente mais curto do que o externo; o espinho externo, além de um pouco mais estreito, tem a ponta aguçada e ligeiramente voltada para fora, como se tivesse sido cortada em bisel, apresentando ligeira concavidade externa, caracteres que diferenciam as espécies *ovale* e *aureolatum*. Em alguns lotes, entretanto, êstes caracteres podem estar muito atenuados. Nas coxas II e III há um só espinho de posição externa e pouco desenvolvido e na coxa IV um forte espinho largo, curto, encurvado para dentro e de ponta afilada, podendo, entretanto, ter apenas leve curvatura, tal como é descrito por SCHULZE em *A. ovale krieg*. O órgão de Haller é do mesmo tipo desenhado por SCHULZE para a fêmea de *A. aureolatum*, apresentando cinco pêlos na cápsula e cinco ou seis na concha (*Wanne* de SCHULZE), dos quais um longo.

Gnatossoma. De comprimento médio, medindo cêrca de 1,0 mm a 1,2 mm desde a base do capítulo, inclusive, ao ápice dos palpos, podendo atingir até 1,3 mm nos exemplares mais robustos. A base do capítulo tem os bordos laterais angulosos e o posterior reto ou levemente côncavo. A superfície é deprimida na face dorsal percebendo-se às vêzes vestígios de áreas porosas, apresentando-se pontilhada; a côr é castanha com bordos freqüentemente mais escuros, marron. Cornos sempre presentes, mas não de superfície elevada. Face ventral da base do capítulo com depressão transversal, bordo posterior levemente convexo, às vêzes com mancha clara ao nível da inserção dos palpos. Hipostômio espatu-

lado, com sutura mediana longitudinal, mais fino na região onde terminam atrás as fileiras de dentes. Fórmula 3 3, com dentes maiores na região do centro, com 6-7 elementos em cada fileira, transformando-se atrás em escamas não muito nítidas; corônula com região central ligeiramente saliente, nos lados da qual aparecem dois entalhes rasos. Bainhas das quelíceras mais curtas do que o hipostômio e mais claras do que a superfície do gnatossoma. Palpos delicados, não nodosos, parecendo, quando vistos pela face dorsal, estreitados na base e progressivamente alargados para o ápice; 1.º artículo com pequena saliência ventral com a forma de um bordo cortante longitudinal; 2.º artículo ligeiramente estreitado na base, onde é também deprimido no sentido lateral formando um bordo cortante não saliente; seu comprimento é de mais de 1 ½ vez o tamanho do 3.º artículo; êste tem o bordo dorsal arredondado e o ventral pràticamente reto, apresentando-se deprimido na região do orifício do 4.º artículo.

FÊMEA

De conformação ovóide, porém de propodossoma menos estreitado do que nos machos de igual tamanho, exceto os muito robustos. Ombros quase sempre presentes, porém nunca muito acentuados. Colorido do tegumento descoberto castanho, às vêzes chocolate e raramente ocráceo. Gnatossoma longo.

Dimensão nas fêmeas que não sugaram 5,0 mm por 2,5 mm, medidas desde o ápice dos palpos. Nelas o escudo dorsal cobre área maior do que a da zona descoberta. O escudo é aproximadamente pentagonal com os bordos póstero-laterais tendendo para retos e fugindo, portanto, ao aspecto dito cordiforme daquelas espécies em que tais bordos são mais convexos.

A coloração de fundo é escura, côr de chocolate e as manchas são côr de cobre ou cremosas. Há sempre uma mancha central com feitio de uma ânfora cujo fundo inclui todo o ângulo posterior do escudo, atingindo o bordo alargando-se para frente para formar o bojo e depois estreitando-se para formar o gargalo, limitado neste ponto pelos sulcos cervicais muito pouco pronunciados, alargando-se de novo à frente, próximo do bocal, entre as fossetas cervicais. Esta mancha, que dá ao escudo o seu aspecto característico, só raramente é totalmente cheia, apresentando ao contrário, quase sempre uma falha mediana, às vêzes circular outras vêzes oblonga, que começa na região do bojo e pode atingir o bocal. Quando a coloração está mal conservada o colorido do ângulo posterior, em qualquer caso, se apresenta mais intenso. Sendo completo o colorido do escudo, existe para fora da mancha central uma outra de cada lado, que da região dos ombros se dirige para traz até o meio do bordo póstero-lateral, mais larga no meio do seu percurso. Estas duas manchas são sempre de colorido menos intenso do que a mancha central e apresentam de regra duas interrupções alongadas. No seu conjunto, estando a coloração bem conservada e

apesar dos traços que interrompem as manchas laterais, o escudo dorsal da fêmea apresenta o desenho que lembra a flor de liz a que fizemos alusão ao distinguir a espécie da fêmea de *aureolatum*.

Pontuações do escudo mais esparsas e menores ao nível do ângulo posterior da mancha central, onde às vêzes faltam quase por completo, e mais densas ao nível das manchas laterais, onde também são maiores e mais profundas, chegando às vêzes a ser confluentes e a formar um pequeno sulco longitudinal que parece um prosseguimento do sulco marginal, interrompendo o colorido onde quer que se encontrem. Em uma fêmea capturada sôbre onça em Almirante, Panamá, as pontuações no ângulo posterior do escudo eram abundantes.

Sulcos cervicais curtos, quase retos, em geral largos, de profundidade grande à frente, mas decrescente para trás, prolongando-se em sulcos cervicais largos, mais pronunciados e mais largos nos exemplares robustos, porém nunca muito prolongados. Em um exemplar de cão, capturado em Costa Rica, os sulcos eram longos e muito profundos.

Olhos sempre muito nítidos, amarelados, pouco salientes, contíguos nos ângulos laterais e à sua frente.

Superfície dorsal descoberta com pontilhado, sulco marginal e festões muito nítidos, variando muito a coloração que pode ir de ocrácea pálida até a côr de chocolate.

As dimensões padrão do escudo dorsal são as seguintes:

PA = 2,0 a 2,2 mm	SS = 1,1
PB = 2,4 a 2,3 mm	SC = 0,3 a 0,2 mm
PM = 1,3 a 1,2 mm	PT = 1,7
TT = 2,5 a 2,1 mm	ST = 1,3 a 1,1 mm
OO = 2,5 a 2,1 mm	NPT = 0,2 a 0,1 mm
OT = 0,08	NST = 0,2 a 0,1 mm

Nos exemplares muito robustos do Brasil Central os desvios dessas medidas são pequenos. TT e OO são pouco maiores; SC um pouco menor.

Face ventral. Lisa, sem pontuações, de pilosidade esparsa e muito curta. Orifício genital ao nível do intervalo entre as coxas II e III, sem debrum mais escuro. Orifício anal com debrum nítido. Sulcos genitais nítidos e completos; sulco anal, quando completo, divergindo à frente até encontrar os ramos divergentes do sulco genital; sulco ano-marginal atingindo o festão mediano. Peritrema largo, de colo aberto, sem alargamento no debrum, com ângulo póstero-interno quase sempre menor de 90°; na única vez em que foi visto êste ângulo mais aberto o colo era extremamente alongado. Mácula estreita, alongada, de polo anterior mais largo. Rebordo do opistossoma sem prolongamentos mamiliformes.

Gnatossoma. Longo, mais longo do que no macho, com palpos delicados, não nodosos, medindo até o ápice dos palpos 1,20 a 1,40 mm pela face dorsal e 1,40 a 1,60 mm pela face ventral.

Base do capítulo com bordo posterior ligeiramente côncavo, bordos póstero-laterais convergentes para trás e enegrecidos, e ântero-laterais divergentes para frente até a bainha das quelíceras; cornos apenas esboçados.

Áreas porosas ovais, divergindo à frente, bem separadas por distância igual à largura. Superfície dorsal da base do capítulo com algumas pontuações finas e esparsas.

Face ventral da base com bordo posterior reto, ângulos póstero-externos arredondados e bordos laterais divergentes para frente.

Hipostômio de fórmula 3 3, com 9 dentes em cada fileira. Corônula de centro muito pouco elevado e sem entalhe.

Palpos finos, de face interna escavada e face externa convexa, com pêlos esparsos curtos. 1.º artículo com bordo ventral afilado no sentido ântero-posterior, não chegando a ser saliência posterior. 2.º artículo estreitado na base, onde tem depressão de curta extensão na face externa, mais largo na união com o 3.º artículo; com bordo ventral largo. 3.º artículo arredondado no ápice, com bordo ventral largo e 4.º artículo fazendo saliência no orifício.

Patas. Coxa I com os dois grandes espinhos característicos desta espécie e de *A. aureolatum* semelhantes aos do macho; espinho interno bem mais largo e de ápice rombo, um pouco mais curto, com 0,57 mm; espinho externo mais afilado, de ponta fina, com leve inclinação do ápice para fora, parecendo talhado em bisel por ter sido aparado do lado interno de diante para trás, com 0,65 mm. Coxas II e III sem espinho algum, com um bordo fino contínuo. Coxa IV com espinho único central, largo e de ponta aguda. Tarso I mais largo no meio, com ligeira elevação antes e depois do órgão de Haller. Tarsos II, III e IV com dois espinhos subterminais, o apical maior.

Nas coleções dos autores a espécie é assinalada nos seguintes hóspedes e localidades:

Coleção Henrique Aragão — Cão; Lôbo do mato, *Dusicyon* sp.; Rapôsa cinzenta, *Dusicyon* sp.; Onça pintada, *Panthera (Jaguarius) onca;* Onça parda, *Felis (Puma) concolor;* Jaguatirica, *Felis (Leopardus) pardalis brasiliensis;* Coati, *Nasua nasua solitaria;* Anta, *Tapirus terrestris terrestris;* Mão pelada, *Procyon concrivorus;* Tamanduá bandeira, *Myrmecophila tridactyla tridactyla;* Rato d'água, *Nectomys* sp.; Rato marron, *Cricetidae* sp.; Rato do mato, *Cricetidae* sp.; Saracura, *Rallidae* sp.; Jacupeba, *Penelope superciliaris jacupemba.* — *Estados*: Amazonas, Distrito Federal, Estado do Rio de Janeiro, Minas Gerais, São Paulo, Mato Grosso, Goiás, Santa Catarina.

Coleção Flavio da Fonseca — Cão, *Canis familiaris;* Cachorro do mato, *Dusicyon* sp.; Onça pintada, *Panthera (Jaguarius) onca;* Onça parda, *Felis (Puma) concolor;* Jaguatirica, *Felis (Leopardus) pardalis brasiliensis;* Coati, *Nasua nasua solitaria;* Anta, *Tapirus terrestris terrestris;* Veado mateiro, *Mazama* sp.; Porco do mato, *Tayassu pecari pecari;* Lontra, *Lutra platensis.* — *Estados*: Pará, Mato Grosso, São Paulo, Paraná, Santa Catarina.

Merece reparo a coincidência dos 7 primeiros hospedeiros nas duas coleções.

Dessa espécie podemos ainda citar os seguintes registros da literatura: México (Koch); México, de *Nasua narica* e de *Mazama sartori* (Rocky Mountain Laboratory); Argentina (Boero); Guatemala, Nicarágua, Costa Rica e Panamá, em parte sôbre o homem e cão (R. M. Laboratory); Guiana Francesa, sôbre cão e homem (Floch).

Amblyomma aureolatum (Pallas, 1772)

Espécie de tamanho médio regulando com o *Amblyomma ovale* Koch, 1844, exceto as fêmeas repletas que parecem ser maiores. Caracteriza a espécie a constância da intensidade do colorido claro do escudo, em ambos os sexos, em contraste com as manchas escuras que são raras e muito estreitas, podendo em alguns casos ser quase imperceptíveis. Mesmo quando o colorido já perdeu o aspecto original, ainda assim é perfeitamente reconhecível, em ambos os sexos, a grande predominância da côr mais clara. Nenhuma outra espécie brasileira de *Ixodidae* apresenta tal aspecto, apenas dêle se aproximando, em certos lotes, as fêmeas do *A. brasiliense* Aragão, 1908, as de *A. mantiquirense* Aragão, 1908 e de *A. incisum* Neumann, 1908, nas quais, entretanto, as áreas escuras são mais extensas do que em *A. aureolatum*. Nos exemplares conservados em líquidos, principalmente nos que contêm pequena quantidade de formol, como o líquido de Mönnig, o colorido claro conserva a côr acobreada original, a qual nos exemplares secos passa a creme ou amarela desbotada ou ocre, esta última côr nos machos, que neste caso são mais brilhantes do que os de outras côres. Em certos lotes as fêmeas repletas ou com engorgitamento adiantado mostram tendência para apresentar tonalidade acinzentada na região anterior e externa do escudo.

É, no sul do Brasil, a espécie melhor adaptada ao cão, no qual se a encontra com grande freqüência nas regiões mais freqüentadas pelo homem. Sem embargo disso, é também encontrada com regularidade em animais silvestres de zonas freqüentadas pelos cães, principalmente em canídeos e felídeos silvestres, bem como em *Procyon cancrivorus*, o Mão pelada. Em *Grison furax*, o Furão, em *Bradypus tridactylus*, a Preguiça tridáctila e em veado foi-nos dado também capturá-lo uma só vez. Em fase ninfal capturamos vários exemplares sôbre um rato silvestre, *Euryzygomatomys spinosus catellus* em Butantan, São Paulo. Nunca encontramos a espécie em localidade em que pudesse ser excluída a existência do cão doméstico. Em certas regiões do Brasil onde o cão é raro a espécie pode ser substituída neste hospedeiro pelo *Amblyomma tigrinum* Koch, 1844, como se dá nos Estados de Mato Grosso e Goiás. A fixação do adulto sôbre o homem já foi observada em caso de Febre Maculosa determinada pela *Rickettsia rickettsi* em São Paulo. Experimentalmente, as larvas se fixam com facilidade à pele do homem, do coelho e do cão. O ciclo evolutivo da espécie foi estudado com minúcia por Fonseca em 1935.

DESCRIÇÃO DO MACHO

A forma oval alongada e o colorido de regra claro tornam a espécie fàcilmente reconhecível já à vista desarmada. Em certos casos, entretanto, o fundo castanho sobressai mais do que as manchas claras, nunca chegando, todavia, à tonalidade carregada dos machos de *A. ovale*. As dimensões variam de acôrdo com o desenvolvimento das ninfas de que se originam, não atingindo, porém, as grandes dimensões e a robustez citada a propósito dos machos de *A. ovale* capturados sôbre animais silvestres das regiões central e setentrional do Brasil. A dimensão total dos exemplares machos examinados oscila entre 2,0 × 1,3 mm.

Pesados em balança de precisão, antes e 10 dias depois de fixados, os machos não apresentam diferença de pêso, parecendo não tomar alimento algum, o que parece característica de machos de *Ixodidae*.

Idiossoma

Escudo dorsal. De contôrno ovóide fortemente estreitado na frente e, portanto, sem ombros. Do sulco marginal resta quase sempre um vestígio mediano, na altura dos peritremas e às vêzes prolongado à frente até próximo do nível da inserção do 3.º par de patas e atrás até o primeiro festão. Tal sulco, porém, nunca é profundo. Fossetas cervicais curtas, ora encurvadas ora retas, profundas; sulcos cervicais, quando aparentes, muito rasos e pouco prolongados, divergentes. Às fossetas e ao lugar dos sulcos, quer êstes existam quer não, corresponde uma faixa escura e pouco prolongada para trás. Pontuações pequenas, iguais, profundas pouco coalescentes, mais densas ao nível do têrço posterior. Fóveas de extrema nitidez, sobressaindo devido ao colorido claro sôbre o qual quase sempre ficam situadas. Festões bem demarcados, geralmente abaulados na região do bordo posterior, com pontuações em geral menores e de regra com o bordo posterior mais escuro. O colorido, quando bem conservado, o que é freqüente, é extensamente amarelo acobreado, apenas interrompido por estreitas manchas longitudinais, das quais as que ficam na região ocular são mais escuras, e a elas correspondendo uma elevação que vai do festão mediano até a proximidade das fóveas; uma anterior situada entre os sulcos cervicais, esta também escura; 3 a 5 manchas laterais. Olhos pouco nítidos por ficarem incluídos na área escura lateral, às vêzes, pigmentados de escuro.

Face ventral. De coloração ora castanha, ora ocre, acinzentada ou amarelada em exemplares conservados. Pilosidade nítida, mais densa para fora dos sulcos genitais. Orifício genital ao nível das coxas II. Sulcos genitais nítidos em tôda extensão, bem como o sulco anal e o ano-marginal. Placas córneas correspondentes aos festões dorsais existem com freqüência, podendo mesmo fazer saliência posteriormente, não sendo tal aspecto, entretanto, tão acentuado quanto o de certos lotes de *A. ovale*. Peritrema não exageradamente estreitado, porém muito mais estreito do que o da fêmea, tendo o ângulo póstero-interno

fortemente obtuso; a mácula é muito anterior e pouco prolongada e o debrum é fino e uniforme, sem espessamento. Mais raramente pode o peritrema apresentar ângulo póstero-interno menos obtuso. Pontuações abundantes de tamanho médio e distribuição uniforme, nelas estando inseridos os pêlos.

Patas. Pouco robustas. Quarto par freqüentemente um pouco mais forte. Articulação com manchas claras no ápice dos artículos. Pilosos no bordo ventral e nas coxas. Coxa I com os dois espinhos largos característicos, o interno mais largo e quase sempre de ponta mais romba do que o externo; êste é em geral mais fino e de ponta mais afilada. Ambos são pràticamente retos, sendo, entretanto, às vêzes perceptível um certo encurvamento da ponta do espinho externo, mas nunca tão acentuadamente e tão constantemente quanto em *A. ovale.* Coxas II e III com o bordo saliente em tôda a largura, porém, mais acentuadamente do lado externo, onde se forma um espinho pouco conspícuo. Coxa IV com espinho interno bem menor do que o comprimento do artículo, menor do que o de *A. ovale* e sem encurvamento, às vêzes tão pronunciado, observado nesta última espécie. O órgão de Haller tem a mesma estrutura reproduzida para a fêmea na figura 48 do trabalho de SCHULZE sôbre êsse órgão, com 6 ou 7 pêlos sensoriais na cápsula e 7 na concha (*Wanne* de SCHULZE), dos quais um longo, um médio e os restantes muito curtos. A grande semelhança estrutural existente entre os órgãos de Haller de *ovale* e *aureolatum* não parece permitir distinguir as duas espécies sòmente por êsse caráter.

Gnatossoma. De tipo longo porém não exagerado. Base do capítulo, vista pela face dorsal, quadrangular, pouco mais larga do que longa, de coloração em geral amarelada, densamente pontilhada, com depressões correspondendo às áreas porosas, que às vêzes estão bem esboçadas. Bordo posterior reto, *cornua* de desenvolvimento médio e sempre presentes. Vista pela face ventral a base do capítulo tem o bordo posterior convexo e mais escuro, ângulos externos arredondados, sendo de superfície lisa e brilhante, sem pontuações, deprimida apenas junto à base do hipostômio. Hipostômio espatulado, com sutura mediana e três fileiras de 5 a 6 dentes subiguais, só os posteriores menores, não havendo aspecto escamoso atrás, como acontece na fêmea. Corônula com ligeira saliência mediana, às vêzes fendida. Palpos achatados e encurvados internamente, os artículos 2 e 3 de largura igual, sem nodosidades e sem o sulco externo acentuado ou a saliência forte do bordo superior apresentados por algumas espécies do gênero, com pilosidade mais acentuada no bordo ventral dos artículos 2 e 3.

DESCRIÇÃO DA FÊMEA

As fêmeas jejunas apresentam idiossoma menos estreitado do que o dos machos na região do podossoma, correspondendo ao escudo dorsal, não sendo, por isso, ovais como os machos. São extremamente características devido à côr amarela dourada extensiva do escudo, no qual

sòmente se percebem raras estrias escuras a contrastar com a área clara. Os ombros são pouco salientes, embora um pouco mais pronunciados do que os dos machos. O gnatossoma é do tipo longo. O tegumento descoberto tem colorido variável do ocráceo ao côr de chocolate. A dimensão das fêmeas em jejum é de 4,4 a 5,2 mm de comprimento total, incluídos os palpos, por uma maior largura de 2,3 a 3,3 mm. Em fêmeas criadas em laboratório foram obtidas fêmeas de 3,5 × 2,0 mm

Face dorsal. O escudo dorsal ultrapassa ligeiramente o meio do idiossoma nas fêmeas jejunas, tendo conformação aproximadamente pentagonal e bordos póstero-laterais quase retos. É pràticamente todo claro, amarelo cremoso, dourado ou acobreado, sendo êste o caráter mais típico da espécie. À vista desarmada apenas se percebem linhas mais escuras correspondendo às fossetas e sulcos cervicais. Ao microscópio entomológico percebe-se que estreita faixa dos bordos do escudo dorsal é de côr diferente, principalmente do nível dos olhos até o ângulo posterior, onde é escura, sendo clara e desprovida de pigmento para frente dos olhos; tal faixa é mais larga ao nível do camerostômio e mais estreitada junto ao ângulo posterior, dos lados do qual ela emite curtos prolongamentos em direção aos sulcos cervicais, não chegando a atingí-los. Com freqüência observam-se curtas estrias mais escuras no meio da distância que vai dos sulcos cervicais aos bordos, bem como na estria ímpar mediana. Pontuações finas, profundas, regularmente distribuídas nas partes claras do escudo, mais finas e mais raras na região mediana posterior e bem maiores e mais aproximadas na faixa escura dos bordos laterais, onde formam fileira contínua. Fossetas cervicais retas ou ligeiramente marcadas, profundas, às quais se seguem sulcos cervicais sob a forma de ligeiras depressões superficiais, as primeiras de coloração mais escura. Ângulos escapulares pouco salientes. Em exemplares repletos e conservados secos tem sido observada mudança de tonalidade do colorido claro do escudo, o qual se torna acinzentado. Olhos situados nos ângulos laterais, para fora da orla escura do escudo, pouco salientes e pouco nítidos. Superfície dorsal descoberta, glabra, de côr variando desde a ocrácea ou parda até à côr de chocolate, com sulco marginal nítido até o 3.º festão de cada lado. Pontuações de tamanho e profundidade médios, regularmente disseminadas, algumas sôbre os festões. Fóveas nítidas apesar do colorido não se prestar a contraste.

Medidas padrão do escudo dorsal, nas fêmeas não engorgitadas, como segue:

TT	1,9 a 2,0	PT	1,4 a 1,5
OO	2,0 a 2,1	SS	0,8 a 1,0
PA	1,7 a 1,9	TS	1,0 a 1,3
PB	2,0 a 2,2	NPT	0,16
PM	1,0 a 1,1	NST	0,16 a 0,24

Tôdas essas medidas são, portanto, um pouco inferiores às de *Amblyomma ovale.*

Face ventral. De colorido geralmente pardo escuro, com pêlos curtos esparsos. Orifício genital ao nível do intervalo entre as coxas II e III nos exemplares jejunos e desviado para frente nos já alimentados. Sulcos genital, ano-marginal e anal presentes, o último com orla anterior amarelada às vêzes ausente. Divisões dos festões nítidas. Rebordo do opistossoma sem prolongamentos mamiliformes. Peritrema triangular, de colo ora curto ora um tanto alongado e de abertura estreita; ângulo póstero-interno com abertura de pouco menos de 90°; debrum sem espessamento; mácula alongada e de polo anterior um pouco mais largo do que o posterior.

Gnatossoma. De tipo alongado, sempre maior do que o do macho, com palpos espatulados, não nodosos, medindo até o ápice dos palpos, pela face dorsal, 1,2 a 1,4, e 1,2 a 1,3 pela face ventral. Base do capítulo com forma tendendo à hexagonal, de bordo posterior côncavo e bordos laterais fortemente convexos, quase divididos em dois; cornos apenas esboçados. Áreas porosas profundas, divergentes na frente, separadas por intervalo menor do que a própria largura; restante superfície dorsal com pontuações irregularmente dispostas e manchas cremosas laterais sôbre fundo também claro. Face ventral da base do bordo posterior convexo, ora um tanto anguloso, ora arredondado nos cantos e projetado para trás sob a forma de estreita lâmina. Hipostômio espatulado, com fórmula 3/3, com fileiras de 7 a 9 dentes aos quais se seguem atrás dentículos muito pouco desenvolvidos com aspecto escamoso. Corônula larga, sem projeção mediana e com ligeiro entalhe central no ápice. Palpos delicados, de face interna fortemente escavada e face externa convexa, com pêlos esparsos, curtos e pontuações. Primeiro artículo com bordo ventral afilado no sentido ântero-posterior, não chegando a formar o que se convenciona chamar de saliência posterior. Segundo artículo estreitado na base, com ligeira depressão diagonal no têrço posterior, da face externa, sendo a restante largura mais ou menos igual em tôda extensão. Terceiro artículo arredondado no ápice, com orifício onde se percebem os restantes artículos.

Patas. Mais claras do que o corpo, com pilosidade esparsa, sendo mais longos os pêlos do bordo ventral. Coxa I com dois longos espinhos que chegam a encobrir mais da metade do artículo seguinte, sòmente comparáveis pelo seu comprimento e forma aos de *A. ovale*. O espinho interno é mais largo do que o externo, pouco mais curto e de ponta mais romba do que êste. O espinho externo é de ápice afilado e cortado em bisel, não tendo, porém, ponta tão encurvada para fora quanto em *A. ovale*. Coxas II e III com bordo posterior ligeiramente saliente, não chegando a constituir espinhos. Coxa III com um espinho curto e rombo. Extremidade distal dos artículos das patas com anel amarelo claro. O órgão de Haller é do tipo mais evoluido e foi desenhado por Schulze em sua Monografia sôbre a estrutura comparada dêsse órgão em *Ixodes*, tendo sido visto por nós seis pêlos sensoriais na cápsula e dois à frente da concha (*Wanne*) e não um como na figura de Schulze.

A espécie é representada nas coleções dos autores nos seguintes hospedeiros e localidades:

Coleção Flavio da Fonseca — Gato do Mato, *Felis (Leopardus) wiedi wiedi;* Veado, *Cervidae* sp.; Mão pelada, *Procyon cancrivorus nigripes;* Grachaim, *Dusicyon (Cerdocyon) thous entrerianus;* Homem, *Homo. Estados*: São Paulo, Santa Catarina, Rio de Janeiro.

Coleção Flavio da Fonseca — Gato do mato, *Felis (Leopardus) wiedi wiedi;* Veado, *Mazama* sp.; Mão pelada, *Procyon cancrivorus nigripes;* Cachorro do mato, *Dusicyon* sp.; Cão, *Canis familiaris;* Onça parda, *Felis (Puma) concolor;* Gato doméstico, *Felis catus;* Furão, *Grison vittatus brasiliensis;* Preguiça. *Bradypus tridactylus;* Rato espinhoso, *Euryzygomatomys spinosus catellus* (em fase de ninfa). *Estados*: São Paulo, Santa Catarina, Paraná, Rio Grande do Sul.

Referências a esta espécie são encontradas: No Paraguai, de Schulze sôbre *Azarafuchs*, portanto, provàvelmente um *Dusicyon (Cerdocyon) thous azarae*. Na Argentina, de Boero. Marajó, Bahia e Teresópolis são referidos por Neumann. Na Colômbia é assinalado por Osorno Mesa. Na Guiana Francesa, por Floch, capturado sôbre cão e homem.

SUMMARY

It was impossible to confirm either Warburton's conservative nor Tonelli Rondelli's opposite belief on the number of valid species after studying many lots of ticks of the *ovale* group, mainly from Brazil. Two species are recognized: *Amblyomma ovale* Koch, 1844 and *Amblyomma aureolatum* (Pallas, 1772), corresponding respectively to *A. fossum* Neumann, 1898 and *A. striatum* Koch, 1844. A list of synonyms is presented. Both species are redescribed and intraspecific morphological variation show to be the cause of the multiplication of species by those working with insufficient material. Color plates of both species are presented and hosts and localities of captures are recorded.

BIBLIOGRAFIA

Aragão, H., 1911, Notas sobre Ixodidas brasileiras. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz,* 3 (2): 145.

Aragão, H., 1936, Ixodidas brasileiros e de alguns países limítrofes. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz,* 31 (4): 795.

Berlese, A., 1888, Acari Austro-Americani. *Boll. Soc. Ent. Ital.*, 20: 193.

Boero, J.J., 1944, Los Ixodideos de la Republica Argentina. *Bol. Tecn. Dir. Gen. Ganad.*, Buenos Aires.1944 e Universidad de Buenos Aires, 1957.

Fonseca, F., 1935, Notes d'Acarologie. XI. Validité de l'espèce et cycle evolutif de *l'Amblyomma striatum* Koch 1844. *Mem. Inst. Butantan,* 9: 18.

Floch, H. & Abonnenc, E., 1940, Ixodides de la Guyane Française. *Publ. Inst. Pasteur Guyane,* 3:

FLOCH, H. & FAURAN, P., 1958, Ixodides de la Guyane et des Antilles Françaises. *Arch. Inst. Pasteur Guyane*, 446:

KOCH, C.L., 1844, Systematische Ubersicht über die Ordnung der Zecken. *Arch. Naturg.*, 10: 217.

KOCH, C.L., 1847 Übersicht des Arachnidensystems 4. Nürnberg.

MESA, E. OSORNO, 1942, Los Garrapatos de la Republica de Colombia. *Rev. Fac. Nac. Agron.*, 5 (16-17): 57.

NEUMANN, L.G., 1899, Revision de la famille des Ixodidés (3ème Memoire). *Mem. Soc. Zool. France*, 12: 211, 217.

PALLAS, P.S., 1772, Spic. zool., etc. 9: 40.

ROBINSON, L.E., 1926, *The genus Amblyomma*. Ticks. A Monograph of the Ixodidea IV.

RONDELLI, M.T., 1937, Ixodoidea. Parte I. *Amblyomma ovale* Koch, *Amblyomma cajennense* Fabricius e la specie de loro affini, nuove o poco note. *Riv. Parassit.*, 1 (4): 273.

SCHULZE, P., 1941, Neues über brasilianische Amblyommen. *Zool. Anz.*, 134 (5-6): 93.

SCHULZE, P., 1941 Über das Zeichnungsmuster von *Aponomma* und über einige bemerkenswerte geographische Rassen von *Aponomma* und *Amblyomma* aus Beludschistan, Australien und Argentinien. *Zool. Anz.*, 134 (7-8): 179.

SCHULZE, P., 1941, Das Geruchsorgane der Zecken. *Z. Morphol. Oekol. Tiere*, 37 (3): 491.

ESTAMPA 1

Amblyomma aureolatum (Pallas, 1772), macho, faces dorsal e ventral. Carlos A. Silva *del.*

Mem. Inst. Oswaldo Cruz,
59(2): 131-148 — Jul., 1961

ARAGÃO & FONSECA: Notas de Ixodologia. IX.

ESTAMPA 2

Amblyomma aureolatum (Pallas, 1772), fêmea, faces dorsal e ventral. Carlos A. Silva *del*.

Mem. Inst. Oswaldo Cruz,
59(2): 131-148 — Jul., 1961

ARAGÃO & FONSECA: Notas de Ixodologia. IX.

ESTAMPA 3

Amblyomma ovale Koch, 1844, macho, faces dorsal e ventral. N. Botelho *del*.

Mem. Inst. Oswaldo Cruz,
59(2): 131-148 — Jul., 1961

ARAGÃO & FONSECA: Notas de Ixodologia. IX.

ESTAMPA 4

Amblyomma ovale Koch, 1844, fêmea, faces dorsal e ventral. N. Botelho e Carlos A. Silva *del.*, respectivamente

Mem. Inst. Oswaldo Cruz
59(2): 131-148 — Jul., 1961

ARAGÃO & FONSECA: Notas de Ixodologia. IX.

Reprinted from:
Rev. Brasil. Biol., 20 (4) : 425-427
Dezembro, 1960 — Rio de Janeiro, GB

CONSTITUIÇÃO CROMOSSÔMICA DE DUAS ESPÉCIES DE ARANHAS DO GÊNERO "LOXOSCELES"[1]

WILLY BEÇAK e MARIA LUIZA BEÇAK
Instituto Butantan, São Paulo

(Com 4 figuras no texto)

As aranhas do gênero *Loxosceles* (Loxoscelinae, Scytodidae) habitam as zonas tropicais, sub-tropicais e temperadas no mundo inteiro. São de vida sedentária, hábitos noturnos, encontradas na natureza em lugares escuros como buracos e grutas, sob pedras e casca de árvores ou em locais de construção, sob tijolos, telhas e madeira e em fendas de paredes. Produzem teias irregulares, brancas, adesivas, em forma de flóculos (GERTSCH, 1958).

O gênero *Loxosceles* (HEINECKEN & LOWE, 1832 (1835)) apresenta os caracteres gerais da sub-família. As dimensões do corpo variam de 8 a 15 mm, tendo as pernas de 18 a 30 mm. Caracterizam-se pela coloração amarelo-cinzenta do corpo e das pernas, côr ferruginosa das quelíceras, fronte e lábio. Apresentam abdômen ovalado e mais elevado que o cefalotórax. Êste é alongado, achatado na parte anterior e levemente bilobado na parte posterior. A parte correspondente ao "cephalon" é saliente e delimitada posteriormente por dois sulcos divergentes. Apresentam seis olhos dispostos em três díadas, havendo geralmente pequena diferença de tamanho entre os mesmos. Os machos são geralmente menores e mais delgados que as fêmeas, e têm pernas mais longas em relação ao comprimento do corpo (BÜCHERL, 1960).

O gênero *Loxosceles* inclui um grande número de espécies distribuídas no mundo inteiro, sendo uma tropical cosmopolita, 3 paleárticas, 8 etiópicas, 15 norte e centro-americanas e 16 sul-americanas (BÜCHERL, 1960).

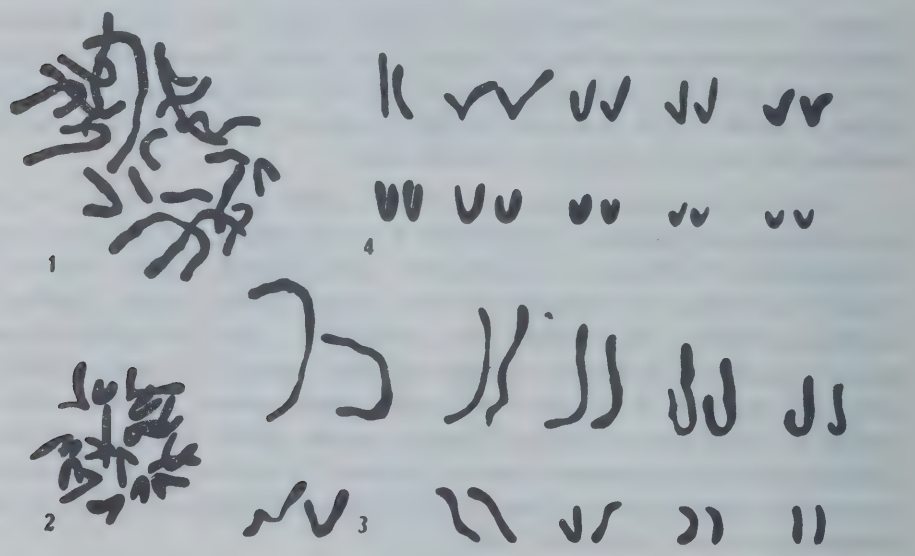
Foram-nos gentilmente cedidos, pelo Dr. Bücherl, exemplares machos de duas espécies, *Loxosceles rufescens* (Dufour, 1820) e *Loxosceles rufipes* (Lucas, 1834), provenientes de São Paulo (Taipas, Morumbi, Butantan) e Montevidéu, que utilizamos como material para o presente trabalho.

---

[1] Recebido para publicação a 26 de agôsto se 1960.
Trabalho realizado com auxílio do Fundo de Pesquisas do Instituto Butantan.

As aranhas foram dissecadas em solução fisiológica, os testículos retirados e colocados em orceína 1% — ácido acético 45%. Após 15 minutos de fixação e coloração o material foi transferido para lâmina, contendo uma gôta de solução de glicerol 10% — ácido acético 45% e recoberto com lamínula (RITTER, 1958). Procedeu-se então a técnica do esmagamento, seguida de lutágem e exame ao microscópio. Foram estudados 20 exemplares machos de cada espécie. Nas preparações foi analisada a meiose sendo os desenhos feitos com câmara clara.

Todos os espécimens de *Loxosceles refescens* e *Loxosceles rufipes* estudados apresentaram o mesmo número diplóide de cromossomas, 20. Nas figuras 1 a 4 podem ser observados os cariótipos das duas espécies, com os respectivos cromossomas dispostos em pares. Infelizmente não pudemos encontrar, como seria desejável, células de *L. rufescens* e *L. rufipes* exatamente no mesmo estádio.



Célula diplóide, de testículo, com 20 cromossomas — Fig. 1: De *Loxosceles rufescens*, de Táipas; fig. 2: de *Loxosceles rufipes*, de Montevideu. — Cromossomas de célula diplóide de testículo, dispostos em pares — Fig. 3: De *L. rufescens*; fig. 4: de *L. rufipes*.

As duas espécies descritas são morfològ icamente muito semelhantes. Segundo BÜCHERL, os machos só podem ser distinguidos por certas particularidades nas medidas das peças que compõem o palpo e pela relação entre as medidas das pernas, enquanto que, as fêmeas só podem ser distinguidas por esta última característica. A semelhança nos hábitos e na morfologia das duas espécies e a identidade do número de cromossomas não permitem confirmar pertencerem os exemplares a espécies diferentes.

Sòmente estudando a reprodução e a descendência dessas aranhas, assim como suas populações, será possível esclarecer se *Loxosceles rufescens* e *Loxosceles rufipes* são realmente espécies diferentes ou raças de uma mesma espécie.

SUMÁRIO

O estudo citogenético de duas espécies do gênero *Loxosceles* (*L. rufescens* e *L. rufipes*) demonstra possuírem ambas o mesmo número diplóide de cromossomas, 20 (figs. 1 a 4). A semelhança nos hábitos e na morfologia das duas espécies e a identidade do número de cromossomas, não permitem confirmar pertencerem os exemplares a espécies diferentes.

SUMMARY

The cytogenetics study of two species of the genus *Loxosceles* (*L. refescens* and *L. rufipes)* indicates that both of them possess the same diploid number of chromosomes, 20 (figs. 1-4). The similarity of both species concerning their habits and morphological characteristics as well as the identity of the number of chromosomes do not permit to confirm that the respective specimens belong to different species.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bücherl, W., 1960, Aranhas do gênero Loxosceles e "Loxoscelismo" na América do Sul. I. Introdução, comentários bibliográficos, caracterização da sub-família Loxoscelinae, do gênero Loxosceles e enumeração das espécies da América do Sul. *Comunicação apresentada na XII Reunião da Sociedade Brasileira Para o Progresso da Ciência.*

Gertsch, W. J., 1958, The spider genus Loxosceles in North America, Central America and the West Indies. *Amer. Mus. Novit.,* 1907: 46 pp., 97 figs.

Ritter, H. B., 1958, A simple permanent aceto-orcein stain for free cells, cultures and homogenates. *Stain Techn.,* 33 (4): 167-170, 4 figs.

Reprinted from:
Rev. Brasil. Biol., 21 (3) : 281-286
Outubro, 1961 — Rio de Janeiro, GB

HUMAN CHROMOSOMES IN SHORT-TERM CULTURES FROM PERIPHERIC BLOOD LEUCOCYTES [1]

WILLY BEÇAK
Instituto Butantan, São Paulo

(With 2 text-figures)

A great development in human cytogenetics must be attributed to methods recently described (TJIO & LEVAN, 1956; FORD, JACOBS & LAJTHA, 1958; NOWELL, HUNGERFORD & BROOKS, 1958; and LEJEUNE, GAUTIER & TURPIN, 1959) for the study of human chromosomes in *in-vitro* cultivated cells.

In this paper we present a simplified method for short-term culture of leucocytes from peripheric blood which can be used for the study of human chromosomes. This method is a modification of the procedures given by NOWELL *et al.* (1958) HUNGERFORD, DONNELLY, NOWELL & BECK (1959) and MOORHEAD, NOWELL, MELLMAN, BATTIPS & HUNGERFORD (1960), which were developed from the techniques of OSGOOD & KRIPPAEHNE (1955), HUGHES (1952), HSU & POMERAT (1953) and ROTHFELS & SIMINOVITCH (1958).

MATERIAL AND METHODS

Growth medium: 0.5 g of casein hydrolysate; 0.1 g glutamine; 0.01 g cysteine hydrochloride; 0.025 g ascorbic acid; 960 ml of Earle's solution (0.68% NaCl; 0.04% KCl; 0.017% $MgCl_2.6H_2O$; 0.02% $CaCl_2$; 0.014% $NaH_2PO_4.H_2O$; 0.1% glucose); 1 ml of complex B solution (0.1% nicotinamide; 0.1% pyridoxal hydrochloride; 0.1% thiamine; 0.1% paraaminobenzoic acid; 0.1% calcium pantothenate; 0.1% choline; 0.01% riboflavine); 1 ml of 0.1% biotin; 1 ml of 0.1% folic acid in 2.8% $NaHCO_3$ were thoroughly mixed and than added with 40 ml of 0.05% phenol red in 0.55% $NaHCO_3$. The medium was sterilized by passing in a Seitz filter. Before use, to each ml of the growth medium, 200 I.U. of penicillin and 50 µg of streptomycin were added.

[1] Received for publication June 19, 1961.
This work was supported by a grant from Instituto Butantan Research Council.

Balanced salt solution: a) 0.8% NaCl; 0.025% KCl; 0.14% Na_2HPO_4; 0.025% KH_2PO_4. b) 0.14% $CaCl_2.2H_2O$. c) 0.1% $MgCl_2.6H_2O$. The three solution were autoclaved separately, cooled and mixed (8 parts of solution *a*, 1 part of solution *b* and 1 part of solution *c*).

Ten ml of venous blood were collected with a sterile syringe transferred to a test tube containing 100 I.U. of heparin and the suspension was mixed. Phytohemagglutinin Difco (Li & Osgood, 1949) in the proportion of 1:50 was added and the mixture shaken. The tube containing the blood was left in an ice cold water-bath for 30-40 min and than centrifuged at 350 r.p.m. for 10 min. The supernatant plasma which contained the leucocytes was separated, transferred to a sterile tube and the leucocytes counted. The tube containing the sedimented blood was again centrifuged for 5 min at 2000 r.p.m. and the supernatant obtained was transferred to another sterile tube. To the plasma containing the leucocytes the growth medium was added in an amount to make the plasma final concentration 30-40%. If necessary the plasma obtained after the second centrifugation was also used. The final concentration of leucocytes in the medium was kept between 1.0 and 1.5×10^3 cells per mm^3. Ten ml of the suspension were added to each sterile test tube and this was covered with a stopper of pure latex in order to prevent the presence of any toxic residues.

The cultures were transferred to an incubator at 37° C, shaken once a day and left there for 72-96 hours. At the end of this period colchicine (Colcemid-Ciba) was added to a final concentration of 1.0×10^{-6}M. The mixtures were left for 6 hours and then shaken and centrifuged for 5 min at 850 r.p.m. The supernatant was discarded and the sediment of each tube resuspended in 1 ml of the balanced salt solution, pH 7.2. To each tube 3 ml of distilled water was slowly added under stirring, the mixtures were incubated for 10 min in a water-bath at 37° C and centrifuged at 650 r.p.m. for 5 min. The supernatant was discarded and a recently prepared fixative (1 part of acetic acid to 3 parts of methyl alcohol) was added to the tubes. After 45-60 minutes fixation, the cells were thoroughly resuspended by continuous pippeting, centrifuged at 850 r.p.m. for 5 min and the supernatant discarded. To the cells, 0.5 — 1.0 ml of the fixative was added in order to obtain the desired concentration. This suspension is not altered even after one month time if kept hermetically closed in a refrigerator.

Clean cover-glasses were immersed in distilled water, the excess of water was shaken off and the suspension of cells was dropped on them. Excess fluid was drawn off with help of a filter paper and the cover glass was dried by gently heating. The preparations were stained for 5-8 hours in recently filtered acetic orcein (1% orcein in 60% acetic acid). During the procedure, care was

taken to keep the face of the coverglass containing the material turned down, to avoid precipitation of the stain on top of it. After this period the cover-glasses

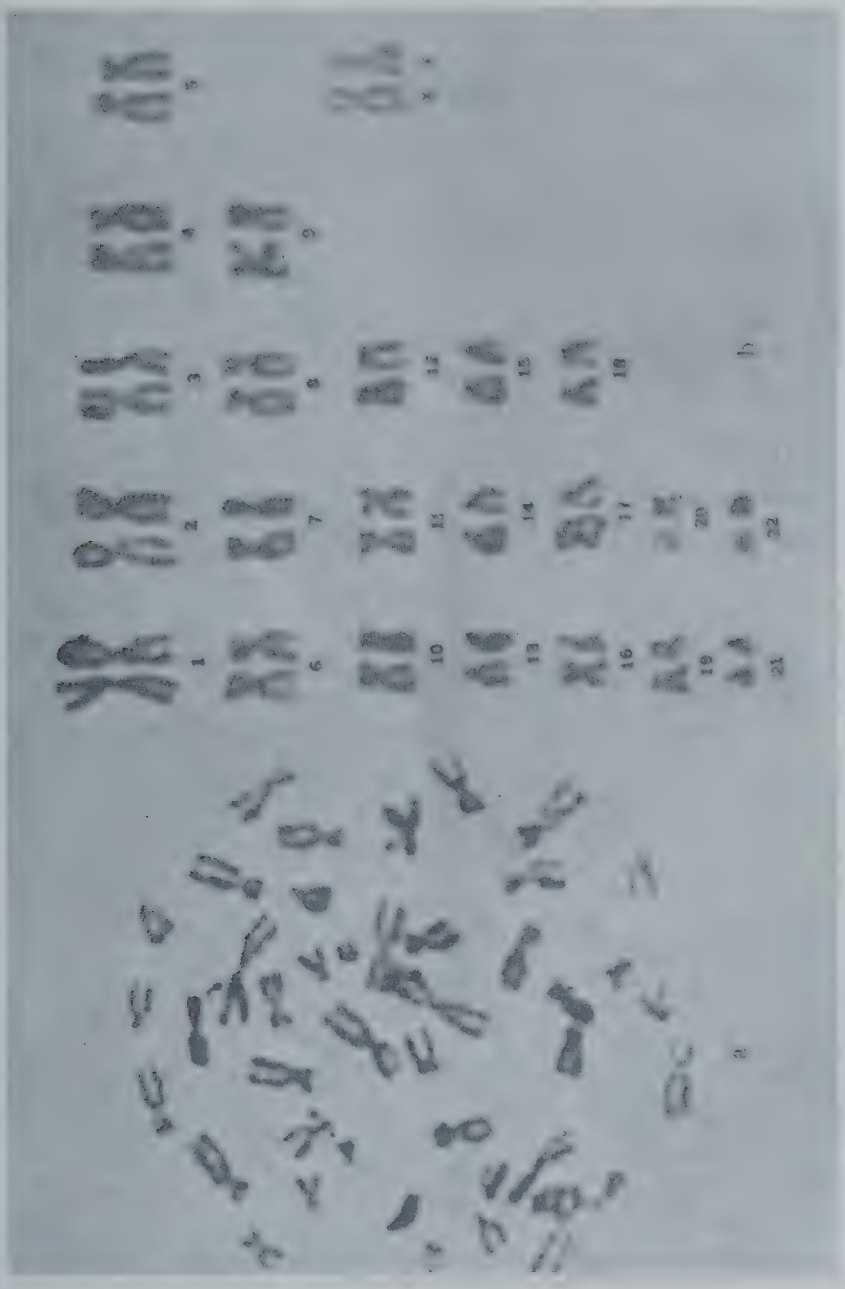


Fig. 1 — a) Metaphase chromosomes of leucocytes, obtained from short-term cultures from peripheric blood of normal human subjects. 46 chromosomes. b) Cell karyogram, with 22 pairs of autosomes and sexual chromosomes XX, numbered according to the Denver system.

were dehydrated with 90% ethyl-alcohol, absolute ethyl-alcohol, xylene and mounted in Canada balsam. After being examined, the selected preparations

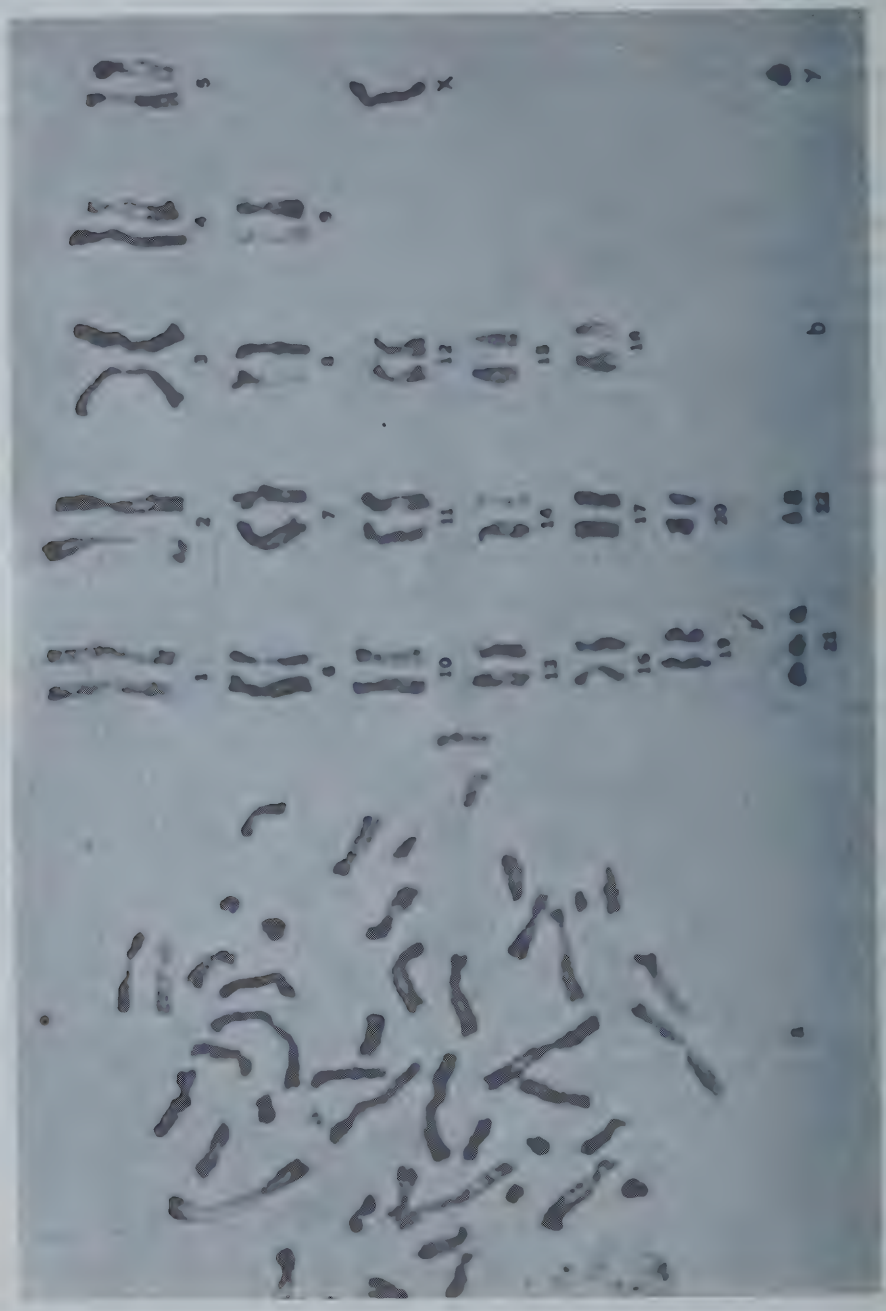


Fig. 2 — a) Metaphase chromosomes of leucocytes cultivated from the blood of mongoloid male patient. 47 chromosomes. b) Cell kariogram with 47 chromosomes presenting trisomy of the chromosome 21, numbered according to the Denver system.

were drawn in camera lucida and photographed. Satisfactory photomicrographs were obtained with contrast phase microscope when convenient films (Kodak microfilm) were used. The amplified negatives were compared with the drawings previously made with the use of *camera lucida*. This procedure is very helpful for the identification and pairing of chromosomes.

RESULTS

Many cultures of leucocytes were made by the method described above, using blood of normal individuals or patients with different anomalies, always with good results. The karyotypes of normal subjects of both sexes presented always 46 chromosomes (fig. 1). In three cases of mongolism (two males and one female) the diagnose was confirmed by counting the chromosomes of their leucocytes. All the cells of these patients presented 47 chromosomes with trisomy of the chromosome 21 (fig. 2). Karyograms of patients with Turner and Klinefelter syndrome, leucemy and other anomalies are being studied.

SUMMARY

A simplified and modified method of short-term culture of peripheric blood leucocytes, for study of human chromosomes is described. This method gives always satisfactory results in the study of chromosomic constitutions in normal human subjects (fig. 1) or patients with different anomalies (fig. 2).

RESUMO

É descrito um método modificado e simplificado de cultura temporária de leucócitos do sangue periférico, para estudo de cromosomas humanos.

Os leucócitos obtidos à partir de sangue venoso, adicionado de anticoagulante e fitohemaglutinina, são ressuspensos em meio de cultura, contendo 30-40% de plasma humano homólogo. A cultura é incubada à 37° C por 72-96 horas sendo então adicionada colchicina. Após 6 horas, os leucócitos são separados por centrifugação, imersos em solução salina, tornada hipotônica, fixados em metanol-acético e aderidos à lamínulas, por secagem com aquecimento ligeiro. Após coloração em orceína acética (60%), as lamínulas são montadas em bálsamo e o material é examinado, desenhado em câmara clara e fotografado em microscópio de contraste de fase.

Cariótipos de indivíduos normais (fig. 1) e com anomalias cromosômicas (fig. 2) estudados segundo êsse método, apresentam resultados satisfatórios.

REFERENCES

FORD, C. E., JACOBS, P. A. & LAJTHA, L. G., 1958, Human somatic chromosomes. *Nature*, 181:1565-1568.

HSU, T. C. & POMERAT, C. M., 1953, Mammalian chromosomes in-vitro II. A method off spreading the chromosomes of cells in tissue culture. *J. Hered.*, 40:23-29.

HUGHES, A., 1952, Some effects of abnormal tonicity on dividing cells in chick tissue cultures. *Quart. J. Micr. Sci.*, 93:207-220.

HUNGERFORD, D. A., DONNELLY, A. J., NOWELL, P. C. & BECK, S., 1959, The chromosome constitution of a human phenotypic intersex. *Amer. J. Hum. Gen.*, 11 (3):215-236.

LEJEUNE, J., GAUTIER, M. & TURPIN, R., 1959, Les chromosomes humains en culture de tissues. *C. R. Acad. Sci. Paris*, 248:602-603.

LI, J. G. & OSGOOD, E. E., 1949, Method for rapid separation of leukocytes and nucleated erythrocytes from blood or marrow with phytohemagglutinin from red beans (Phaseolus vulgaris). *Blood*, 4:670-675.

MOORHEAD, P. S., NOWELL, P. C., MELLMAN, W. J., BATTIPS, D. M. & HUNGERFORD, D. A., 1960, Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood. *Exp. Cell Res.*, 20 (3):613-616.

NOWELL, P. C., HUNGERFORD, D. A. & BROOKS, C. D., 1958, Chromosomal characteristics of normal and leukemic human leukocytes after short-term tissue culture. *Proc. Amer. Ass. C. Res.*, 2:331-332.

OSGOOD, E. E. & KRIPPAEHNE, M. L., 1955, The gradient tissue culture method. *Exp. Cell Res.*, 9:116-127.

ROTHFELS, K. H. & SIMINOVITCH, L., 1958, An air drying technique for flattening chromosomes in mammalian cells grown in-vitro. *Stain Techn.*, 33 (2):73-77.

TJIO, J. H. & LEVAN, A., 1956, The chromosome number of man. *Hereditas*, 42:1-6.

Reprinted from: AMERICAN NATURALIST, 95: 383 - 384, 1961

Vol. XCV, No. 885 The American Naturalist November-December, 1961

LETTERS TO THE EDITORS

Correspondents alone are responsible for statements and opinions expressed. Letters are dated when received in the editorial office.

SHORT-TERM CULTURE OF LEUCOCYTES FROM MONKEY PERIPHERAL BLOOD*

The short-term culture technique of Hungerford, Donnelly, Nowell and Beck (1959), modified by Beçak (1961), has been effectively used for the study of human karyotypes in our laboratory. In an attempt to find a good and simplified method for the study of karyotypes of primates, we used the same technique for the Rhesus monkey (*Macaca mulatta*). The cultures pre-

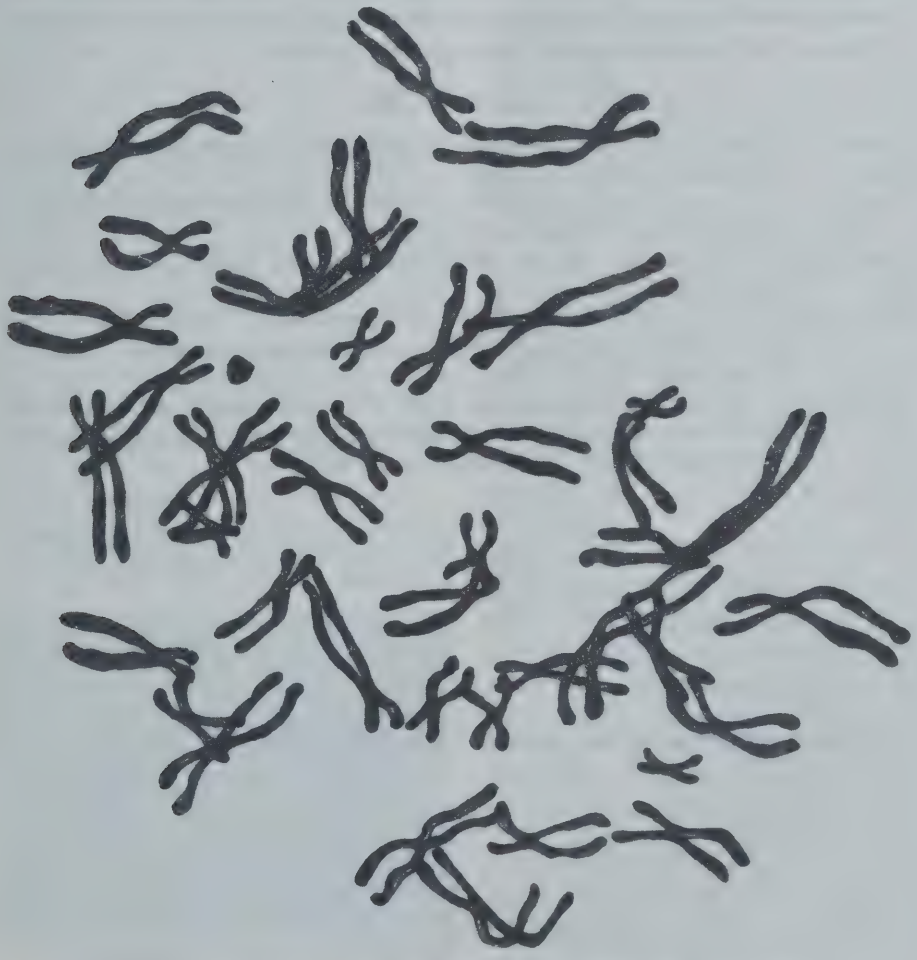


FIGURE 1. Karyotype from short-term culture leucocytes, from a male Rhesus monkey (*Macaca mulatta*), showing 42 chromosomes.

*This work was supported by a grant from the Instituto Butantan Research Fund.

TABLE 1

Chromosome counts of the peripheral blood leucocytes from a male Rhesus monkey (*Macaca mulatta*).

	Chromosome number					
	40	41	42	43	44	Total
Cells counted	...	2	22	...	1	25

sented a high mitosis index with perfectly distinguishable karyotypes (figure 1). The results, presented in table 1, show that the normal number of chromosomes of *Macaca mulatta* is 42. This is in agreement with countings previously made by Darlington and Haque (1955) in spermatogoniae and by Chu and Giles (1957) and by Rothfels and Siminovitch (1958) in kidney cells cultivated *in vitro*.

The present technique has the advantage of not injuring the animal. It probably will be useful for extensive karyological studies of the primates aiming to clarify taxonomic and evolutionary problems.

LITERATURE CITED

Beçak, W., 1961, Human chromosomes in short-term cultures from peripheral blood leucocytes. (In press)

Chu, E. H. Y., and N. H. Giles, 1957, A study of primate chromosome complements. Am. Naturalist 91: 273–282.

Darlington, C. D., and A. Haque, 1955, Chromosomes of monkeys and men. Nature 175: 32.

Hungerford, D. A., A. J. Donnelly, P. C. Nowell and S. Beck, 1959, The chromosome constitution of a human phenotypic intersex. Am. J. Human Genet. 11: 215–236.

Rothfels, K. H., and L. Siminovitch, 1958, The chromosome complement of the Rhesus monkey (*Macaca mulatta*) determined in kidney cells cultivated *in vitro*. Chromosoma 9: 163–175.

W. Beçak
J. D. Andrade†
M. L. Beçak

Laboratório de Genética
Instituto Butantan
São Paulo, Brasil
September 9, 1961

†Under a fellowship from the Brazilian National Research Council.

Reprinted from: Arzneimittel Forschung, (Drug Res.) 10 :774-777, 1960

Aus dem Laboratorium „Zoologia Médica" Instituto Butantan; Caixa postal 65; São Paulo (Brasilien)

Die Tarantelspinne *Lycosa erythrognatha* Lucas 1836

(Familie: *Lycosidae*, Unterfamilie: *Lycosinae*)

Von Wolfgang Bücherl*)

Systematik der Wolfsspinnen

Die Vertreter der Wolfsspinnen wurden 1804 von Latreille in der Familie *Lycosidae vereinigt*. E. Simon teilte diese später in 6 Unterfamilien, deren wichtigste ohne Zweifel die der *Lycosinae* ist. Diese umfaßt unter anderen folgende Gattungen:

Acantholycosa Dahl 1906, *Arctosa* (C. L. Koch 1846), *Aulonia* (C. L. Koch 1848), *Hygrolycosa* Dahl 1908, *Lycosa* Latreille 1804, *Pirata* Sundevall 1833, *Tarentula* Sundevall 1833, *Tricca* Simon 1888, *Trochosa* (C. L. Koch 1846) und *Xerolycosa* Dahl 1908.

Die berüchtigte Tarantel aus Zentral- und Süditalien, tarantola apulica, ist definitiv unter dem Namen *Lycosa tarentula* (Rossi 1790) in die Literatur eingegangen.

Die französische Tarantel oder „Lycose des Pouilles", die im Rhône-Tal und der Umgebung von Narbonne relativ häufig ist und zeitweise als *Lycosa melanogaster, Lycosa tarentula narbonensis, Tarentola melanogaster* oder auch *Tarentola narbonensis* geführt wurde, heißt heute *Lycosa narbonensis* Latreille 1806.

Die spanische Tarantel, die von Dufour 1835 mit dem Namen *Lycosa tarentula* und von E. Simon 1870 mit *Lycosa narbonensis* belegt worden war, hat den wissenschaftlichen Namen *Lycosa hispanica* Walckenaer 1837.

Die südrussische Tarantel schließlich heißt *Lycosa singoriensis*. Neben diesen 4 besonders berühmt gewordenen Taranteln der Alten Welt wurden im Laufe der Jahre mehrere hundert neue Arten sowohl aus Deutschland, England, Frankreich, Spanien, Portugal, Italien, Österreich, den Karpathenländern als auch aus Afrika, Asien, Australien, Nord- und Südamerika beschrieben.

Von den europäischen möchten wir noch *Lycosa fasciiventris* Dufour 1835 aus Spanien, *L. oculata* (Simon 1870) aus Korsika und vor allem *L. radiata* Latreille 1817 erwähnen, da sie oft mit *L. tarentula* verwechselt worden sind.

Von dem amerikanischen Kontinente allein wurden rund 200 Arten beschrieben. Die häufigste in São Paulo, Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul, in Uruguay, Paraguay und im Norden Argentiniens ist *Lycosa erythrognatha* Lucas 1836. Mit ihr sind *Lycosa raptoria* Walckenaer 1837, *L. rufimana* C. L. Koch 1848, *L. erythrostoma* id. ibid. und *Tarentula raptoria* Keyserling 1876 identisch.

Biologische Beobachtungen an *Lycosa erythrognatha*

Viele Jahre hindurch beobachteten wir das Leben von vielen *Lycosa erythrognatha*-Exemplaren, die in Terrarien unserer Laboratorien gezüchtet wurden. Wir können hier auf nur wenige besondere Begebenheiten eingehen:

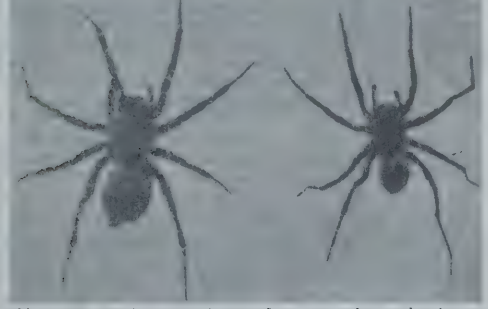


Abb. 1: Ein Pärchen erwachsener Lycosa erythrognatha in annähernd natürlicher Größe. Links: Weibchen, rechts: Männchen.

*) Wir danken der Firma Dr. Willmar Schwabe, Karlsruhe, für die Unterstützung zu dieser Arbeit. Interessierte bitten wir, bei dieser Firma Separata anzufordern.

Die durchschnittliche Lebensdauer schwankte zwischen 500 und 715 Tagen, bei Männchen und Weibchen, wobei die Erreichung der Geschlechtsreife, die zwischen 210 und 360 Tagen einzutreten pflegt, ihr Leben ungefähr in zwei Hälften teilt.

Wenn die Jungen aus dem Eiball schlüpfen, haben sie durchschnittlich die Größe von 1,4 mm. Bis zur Geschlechtsreife machen sie durchschnittlich, außer der ersten Häutung, die sogleich nach dem Verlassen des Eies stattfindet, 11 bis 16 Hautwechsel durch, mit einer Längenwachstumskurve nach folgendem Schema:

Bei den ersten 2—3 Häutungen Längenwachstum gleich 0; von der 4. bis 6. Häutung: 1 mm Wachstum; von der 7. bis 8. Häutung: 1,5 mm Wachstum; von der 9. bis 10. Häutung: 3 bis 3,4 mm Wachstumszunahme; von der 11. bis 13. Häutung; 2,8 mm Zunahme und von der 14. bis 16. Häutung: 0,5—0,8 mm Wachstumszunahme. Auf diese Weise wird durch stufenartiges Wachstum aus dem 1,4 mm großen Spinnchen das 23 bis 26 mm große Tier, dessen Beinspannweite schon rund 60 bis 70 mm beträgt.

Die schneller wachsenden Tiere, die auch viel mehr fressen, erreichen diese Größe schon mit 11 Häutungen.

Als Nahrung gaben wir den Jungtieren ausschließlich *Drosophila*, den älteren Fliegen und den Erwachsenen junge Grillen usw. Sämtliche Spinnen fraßen regelmäßig, fast täglich. Nur vor dem Hautwechsel wird eine 2- bis 3tägige Freßpause eingelegt, die sich schon auf 8 Tage erstrecken kann, wenn die Tiere dem Stadium des Erwachsens nahe sind.

Einige Tage nach der Geschlechtshäutung, nach der nun Männchen und Weibchen geschlechtsreif geworden sind, erbauen die Männchen ein zierliches Sperma-Netz, etwa 1 cm vom Boden entfernt, in Gestalt einer vierarmigen Kreuzbrücke; sie deponieren in derem Zentrum ihre Spermaflüssigkeit und saugen dieselbe von unten her in die beiden Kopulationsbulben, die sich am Ende der beiden Tarsen der Palpen befinden.

Treffen die Männchen ein Weibchen, so springen sie aus der Nähe von etwa 8 bis 12 cm plötzlich auf dasselbe, reiten darauf, drehen es bald nach links, bald nach rechts, so daß sie alternierend ihre Kopulationsbulben bald in die linke, bald in die rechte Samentasche einführen und diese mit Sperma anfüllen können. Die viel kräftigeren Weibchen verfallen dabei in eine Art starre Passivität. Selbst nachdem sie das Männchen schon längst verlassen hat, bleiben sie noch einige Minuten reglos liegen.

Danach erbauen die Weibchen sowohl eine Wohnkammer als auch eine Brutkammer. Letztere ist eine Erweiterung der untersten Lage der Wohnkammer und erreicht durchschnittlich 2 cm Breite, 3—4 cm Länge und 2—3 cm Höhe. Beide werden innen mit Seide wattiert. Hierauf wird die untere Hälfte des runden Eiballes gesponnen und mit rund 800 bis 1000 kugelrunden, nicht agglutinierten Eiern belegt. Dann wird die obere Hälfte der Kugel gesponnen und beide Hälften in der Äquatorzone mit feinem Gespinst zusammengeheftet und unter den Spinnwarzen fürderhin mit herumgetragen. Das Muttertier merkt genau den Zeitpunkt, wann die Jungen schlüpfen und öffnet von außen den Eiball. Die vielen Jungen quellen heraus, klettern über Kopf, Brust und Abdomen der Mutter und machen es sich da bequem; sie fertigen kleine Gespinste an, unternehmen von dort aus und dorthin zurück ihre ersten Ausflüge; sie wechseln hier zweimal ihre Haut und verlassen die Mutter erst ungefähr 10 bis 14 Tage nach dem Schlüpfen.

Kaum 2 bis 8 Tage hinterher erbaut das Muttertier eine zweite Oothek. Sie legt wiederum 500 bis 800 Eier in diese usw. Später wird oft eine dritte Oothek mit noch etwa 200 befruchteten Eiern und in seltenen Fällen sogar noch eine 4., diese nurmehr mit 20 bis 50 zum Teil schon unbefruchteten Eiern, angelegt.

Dazwischen findet keine neue Kopulation statt. Das Muttertier ist nach der letzten „Jungenaufzucht" so er-

schöpft, daß es meist schon stirbt, wenn die Jungen sich noch auf ihrem Rücken befinden.

Die Brutfürsorge- und Brutpflegezeit läßt sich zeitlich in folgendes Schema einteilen:

Verflossene Zeit von der Kopulation bis zur 1. Eiablage 30—40 Tage;
Verflossene Zeit von der 1. Eiablage bis zum Schlüpfen 40—45 Tage;
Verflossene Zeit vom Schlüpfen bis zur Dispersion 10—14 Tage.
2 bis 8 Tage Pause; dann Erbauung der 2. Oothek, usw.

Bei 3 „Würfen", die Ruhepausen mit einbezogen, werden rund 160 bis 190 Tage verbraucht; bei 4 schon 210 bis 240. Rechnet man noch die 30 bis 40 Tage dazu, die zwischen Kopulation und 1. Eiablage zu liegen pflegen, so kommt man auf eine zweite Lebensperiode der erwachsenen Weibchen von rund 200 bis 280 Tagen.

Tarantismus

Während Aristoteles, Cl. Aelianus, Strabon und der arabische Philosoph Rhases so genaue Beschreibungen der Vergiftungssymptome durch Spinnenbisse gaben, daß wir dafür leicht die auch heute noch in den südöstlichen Mittelmeerländern wohnende Kugelspinne, *Latrodectus tredecimguttatus*, verantwortlich machen können, ist diese Spinne, die zweifelsohne auch um Tarent herum häufig war und in gewissen Jahren scharenweise auftreten konnte, im Mittelalter sonderbarerweise nie für den „Tarantismus" verantwortlich gemacht worden.

Die damals beschriebenen Symptome des „Tarantismus" — heftiger Schmerz, der sich mehr und mehr ausbreitet, intensive Fieberanfälle, Muskel- und Eingeweide-Schmerzen, Übelkeit und Erbrechen — und seiner Heilung, bei der das Opfer nach dem Rhythmus einer immer rascher werdenden Geigenmusik (der Vorläuferin der „Tarantella") stundenlang zu tanzen hatte, bis es schäumte, in Schweiß gebadet, schwindlig und außer sich war und erschöpft zusammenbrach, um am nächsten Morgen wieder gesund, wenn auch noch schwach, zu sein, decken sich in der Tat mit denen, die durch den Biß von *Latrodectus*, zu dem die „Schwarze Witwe" gehört, verursacht werden.

Malaria, Epilepsie, die Große Hysterie und Massensuggestion mögen, außer grobem Simulantentum, viel dazu beigetragen haben, um Mitleid und Hilfe der Umstehenden auf sich zu lenken.

In Wirklichkeit kam der Tarantismus also nicht von der Tarantel = *Lycosa*, sondern ist, soweit er überhaupt als Folge von Spinnenbissen gelten kann, auf *Latrodectus* zurückzuführen; er müßte also richtiger „Latrodectismus" heißen. Der Tarantismus als solcher ist ausgestorben, obwohl die beiden Spinnengattungen auch heute noch in den genannten Ländern vorhanden sind. Kein anderer als der Homöopath Ozanan hat dazu beigetragen, mit dem Tarantismus-Mythos aufzuräumen.

Versuche mit den *Lycosa*-Giften

Nachdem die Systematiker alle *Lycosa*-Arten mehr oder weniger glücklich unter Dach und Fach gebracht hatten und einige Arten auch in Bezug auf Oothekbau, Eiablage, Häutungen und Lebensdauer relativ gut untersucht worden waren, und nachdem man festgestellt hätte, daß die Lycosiden ausschließlich Raubspinnen sind, die ihre Beute im Sprunge zu überraschen pflegen, sie durch einen giftigen Biß überwältigen, lähmen und aussaugen, muß es uns wundern, daß sich selbst bis auf den heutigen Tag kaum Wissenschaftler gefunden haben, welche sowohl mit europäischen als auch mit amerikanischen Arten Experimente angestellt haben.

Freilich stellte man fest, daß es kaum eine angriffslustige *Lycosa* gibt. Aus Süditalien, Südfrankreich und Spanien, wo *L. tarantula, narbonensis, hispanica* und andere Arten immer noch häufig sind, kennt kaum irgend jemand einen Unfall.

Von den größeren Arten Österreichs, Bessarabiens und Südrußlands, den *Lycosa infernalis* und *singoriensis*, berichtet Racowitz, ihr Biß erzeuge höchstens eine lokale Schwellung, mit oder ohne Fieber.

Manche Arten Nordamerikas beißen zwar (nach Gertsch) besonders wenn sie unsanft oder ungeschickt berührt werden, aber das Ganze pflegt rascher vorbeizugehen als ein Bienenstich.

Fabre beobachtete den Tod eines Sperrlings 24 h und den eines Maulwurfs 48 h nach dem Biß von *L. narbonensis*.

Pollock berichtete, daß die *L. ingens* der Insel Madeira durch ihren Biß kleine Lazertilien töten könne.

Die ersten experimentellen Versuche, die uns Aufschluß über die Lycosiden-Gifte überhaupt brachten, wurden von V. Brazil und J. Vellard mit *Lycosa erythrognatha* (sie nannten diese fälschlicherweise *L. raptoria)* durchgeführt. Außerdem erwähnen sie Versuche mit *L. ornata* und *pampeana*, ohne einen Unterschied mit dem Gift der ersteren bemerkt zu haben.

Nachdem sie eingangs vergeblich versucht hatten, die Wirkung des Giftes durch den direkten Biß von Laboratoriumstieren zu demonstrieren, und nachdem auch parenterale Einspritzungen der mit sterilem Sande zerriebenen und in physiologischer Lösung suspendierten Giftdrüsen keine eindrucksvollen Resultate erbracht hatten, gelang es ihnen, die beiden Giftdrüsen aus der Spinne zu entnehmen, vorsichtig von den Chelizeren zu befreien und bei 37° C zu trocknen und zu wägen. Hierauf legten sie die Drüsen in physiologische Lösung, zerquetschten sie leicht mit einem Glasstabe, trockneten die entleerten Drüsensäckchen von neuem bei 37° C und wogen sie wiederum. Die Gewichtsdifferenz ergab in mg das erhaltene Gift. Da ihnen das Volumen des Lösungsmittels bekannt war, wußten sie bei jeder Inokulation genau, wieviele mg Gift sie eingespritzt hatten.

Nach dieser keineswegs exakten Methode, erhielten sie 1, höchstens 2 mg Trockengift pro Drüse oder 2 bis 4 mg Gift pro Spinne. Das frische Gift soll, je nach den Wetterverhältnissen, bald sauer, bald alkalisch reagiert haben. Es zeigte keinerlei Beeinflussung der Blutgerinnung; auf Gelatine war es nicht proteolytisch und auf Blut war keine Hämolyse zu beobachten. 2 mg, in die Vene einer Ratte gespritzt, erzeugten keinerlei Symptome, ebenso nicht 5 mg in die Vene eines Kaninchens. Bei 10 mg iv. beobachteten sie Dispnoe, erhöhte Salivation, Schläfrigkeit und Paresien, die bald wieder vorübergingen. 2,5 mg, in die Flügelvene einer Taube injiziert, erzeugten wiederum keine bemerkbaren Symptome; bei 3 mg jedoch erschienen hintereinander Salivation, Dispnoe, progressive Asthenie und multiple Paresien, die nach 24 h zum Tode des Tieres führten. Bei 5 mg iv. stirbt die Taube sofort.

Mit Standardlösungen von je 5 mg Gift pro ml Inokulum, intrakutan gespritzt, konnten Brazil u. Vellard bei Schafen, Meerschweinchen und am Kaninchenohr die lokal nekrotische Wirkung des Lycosiden-Giftes feststellen. Sie bewirkte nach 24 bis 48 h am Kaninchenohr eine pfennigstückgroße Perforation.

Symptomatologie menschlicher Unfälle

Lycosa erythrognatha ist auf dem freien Lande um São Paulo sehr häufig. Als wir eine große Fangaktion durchführten, erhielten wir pro Jahr durchschnittlich 12000 bis 15000 lebendige Exemplare. Eine gewisse Zeit ihres Lebens sind die Weibchen seßhaft und fertigen über dem Boden ein tuchartiges dichtes Gewebe an, mit einem Unterschlupfloch in der Mitte und zwei Ausgängen. Darunter erbauen sie ihre Wohn- und Brutkammer. Zur Regenzeit, wenn die Grundwasser allmählich ansteigen, verlassen sie ihren Wohnort und flüchten in die menschlichen Wohnungen, wo sie sich überall an dunklen Orten, auch in den Kleidern, Schuhen usw. verstekken. So kommen sie natürlich oft mit dem Menschen in Kontakt und beißen zu, wenn sie gedrückt oder gar zerquetscht werden. Daß sie selbst unter diesen Umständen sehr wenig aggressiv sind, geht aus der Unfallstatistik hervor. Im Krankenhaus Butantans „Vital Brazil" werden jährlich rund 200 bis 300 Fälle behandelt. Wirkungen des Giftes auf das zentrale oder vegetative Nervensystem, auf die Sekretionen, auf Leber und Nieren, Herz und Blutkreislauf usw. konnten nie festgestellt werden.

Wie schon Brazil 1917, Brazil u. Vellard 1925 und 1926, Botelho 1922 und Guimarães 1923, so stellen auch die Ärzte dieses Krankenhauses immer wieder nur eine lokale Giftwirkung an der Einstichstelle und ihrer Umgebung fest. Im Augenblick des Bisses pflegt ein mehr oder weniger heftiger Schmerz aufzutreten, der jedoch bald wieder abflaut. Einige Stunden später tritt eine leichte Anschwellung um die Stelle des Bisses herum auf und die Schmerzen kommen ebenfalls wieder. Etwa 12 bis 15 h später verwandelt sich die Zentralstelle der Schwellung in ein mehr oder weniger

ausgedehntes erhärtetes Ödem mit etwas Blutaustritt, Schorfbildung und Dunkelfärbung um die Biß-Stelle herum. In etwa 20% der Fälle haben die Patienten jetzt etwas Fieber und generalisierten urtikariellen Befall mit heftigem Juckreiz.

Das ist gewöhnlich der Zeitpunkt, an dem der Arzt aufgesucht wird. In einem beachtlichen Prozentsatz der Unfälle wird die lokale Induration größer; um die Zentralstelle herum entstehen größere und kleinere weißliche Bläschen, die mit Flüssigkeit gefüllt sind, nässen und aufplatzen und die schorfige Zentralstelle benetzen. So entsteht eine weißliche Kruste mit Randpusteln, die wiederum aufbrechen. Auf diese Weise vergrößert sich die nekrotische Stelle immer mehr. Nach etwa 8 Tagen wird die Kruste im ganzen abgestoßen und es liegt eine offene, nicht tiefe Wunde vor, die oft 3 bis 6 cm² erreicht. Sie verschorft von neuem, neue Quaddeln entstehen; eine noch größere Kruste bildet sich und alles schilfert von neuem ab.

So entsteht allmählich aus der intrakutanen Biß-Stelle von kaum 2 mm² eine nekrotische Wunde von 3—10, sogar 20 cm² Ausdehnung, die Arm, Bein oder Brust bedecken kann. Die Gefahr sekundärer Infektionen ist damit gegeben.

Erst nach etwa 8 Wochen klingen diese schwereren Fälle ab und kommen definitiv zur Vernarbung. Die Narbe ist groß, gegen die Unterfläche verschiebbar und schmerzt, besonders bei Witterungswechsel.

Das *Lycosa*-Gift zeigt also in der Tat besondere Eigenschaften. Je tiefer es im Tierversuch parenteral einverleibt wird, um so geringer sind die Wirkungen. 0,8 bis 1,0 mg jedoch, intrakutan gegeben, genügen, um die betroffenen Cutiszellen, die Epidermiszellen darunter und die Oberflächenschicht der Muskularis direkt zu zerstören. Die kaum nennenswerten allgemeinen Symptome lassen auf keine oder nur eine ganz geringe Absorption des Giftes schließen.

Die meisten Fälle sind mit Antihistaminica- und Antibiotica-Salben zu heilen. Die therapeutischen Maßnahmen müssen denen einer Ekzembehandlung gleichen. Schwerere Fälle werden durch das Soro Anti-Lycosico, das Butantan herstellt, prompt geheilt.

Gewinnung des reinen Giftes

Auf elektrischem Wege haben wir viele Hunderte von *Lycosa erythrognatha* laufend entgiftet. Ihr Gift ist eine klare gelbliche Flüssigkeit von neutraler Reaktion. Im Vakuumexsikkator, unter Lichtabschluß, läßt es sich bequem trocknen und aufheben.

Bei unseren Arbeiten haben wir folgende Durchschnittswerte pro Spinne gefunden: 0,7—0,8 mg Trockengift als kleinste Mengen, 1,4—1,8 mg als mittlere Durchschnittsmengen und 2,2—2,8 mg als Höchstwerte. Diese Auswertung geschah an 500 Spinnen. Eine jahreszeitliche Schwankung konnte in dem Sinne konstatiert werden, daß in den kühleren Wintermonaten, in denen die Spinnen sonderbarerweise aggressiver sind, die Durchschnittsmengen des Trockengiftes um einige Zehntel mg unter diesem Schema und in den heißeren Sommermonaten über demselben liegen.

Ermittlung der DL_{50}

Nach der von Redd u. Münch 1938 beschriebenen Methode haben wir mehrere Versuche zur Ermittlung der DL_{50} angestellt und folgende Resultate erzielt:

0,010—0,013 mg Trockengift = pro g/Maus, intravenös;
0,130—0,150 mg " = pro g/Maus, intramuskulär;
0,120—0,145 mg " = pro g/Maus, intrakutan;
0,009—0,011 mg " = pro g/Taube, intravenös;
0,085—0,097 mg " = pro g/Taube, intramuskulär;
0,012—0,014 mg " = pro g/Ratte, intravenös;
0,140—0,157 mg " = pro g/Ratte, intramuskulär.

Keines der Tiere äußerte Schmerz. Bei Mäusen und Ratten kam es wohl zu einer Sträubung der Haare, aber zu keinen Schweißausbrüchen. Bis kurz vor ihrem Tode konnten sie sich frei bewegen; ihre Atmung war etwas beschleunigt; kein Torpor-Zustand und keine depressorischen Erscheinungen waren zu beobachten, eher ein unruhiges Verhalten.

Vergleicht man die 50%ig tödlichen Giftmengen mit dem Giftinhalt der beiden Drüsen einer Spinne, so kommt man zu dem Schluß, daß diese gerade noch eine 20 g schwere Maus zu töten vermag.

Chemische und physiologische Giftanalysen sind zur Zeit im Gange und werden sicher viel Aufschlußreiches bringen.

Zusammenfassung

Neben einem systematischen Überblick der häufigsten mitteleuropäischen Tarantel-Arten der Gattung *Lycosa* wird die brasilianische *Lycosa erythrognatha* sowohl in bezug auf ihre Lebensgewohnheiten, Kopulation, Eiablagen, Häutungen, Wachstum und Lebensdauer als auch in bezug auf die Wirkungen ihres Giftes am Menschen beschrieben. Die mindesten, mittleren und höchsten Giftmengen pro Exemplar der Spinne und die 50%ig tödlichen Giftmengen (DL_{50}) für Mäuse, Tauben und Ratten bei intravenöser wie intramuskulärer Applikation werden angegeben.

Summary

The Tarantula Lycosa Erythrognatha Lucas 1836

Following a systematic review on the more frequent central European tarantula of the species *Lycosa*, the Brazilean *Lycosa erythrognatha* is described including data on its life habits, copulation, deposition of eggs, skin shedding, growth and duration of life. The effect of its poison in human beings is also described. The minimum, medium, and maximum amount of poison per specimen and the LD_{50} in mice, pidgeons and rats, following intravenous and intramuscular application, are described.

Literatur

Vellard, J., Le Venin des Araignées, Paris 1936
Brazil, V. u. Vellard, J., Mem. Inst. Butantan II (Fasc. unico), 5—78 (1925); III (Fasc. unico), 243—301 (1926)
Simon, E., Histoire Naturelle des Araignées, Paris 1897
Fabre, Nouveaux souvenirs entomologiques, Paris 1822
Pollock, Ann. Mag. Nat. Hist. 1872
Bücherl, W., Südamerikanische Spinnen und ihre Gifte, Arzneim.-Forsch. 6, 293 (1956)

Verantwortlich für die Redaktion: Dr. W. Saenger; Verlag: Editio Cantor, Aulendorf i. Württ., Telefon 431
Druck: Vereinigte Buchdruckereien, A. Sandmaier & Sohn, Buchau a. F.

Bezugsbedingungen: Die Zeitschrift erscheint monatlich einmal. Sie kann vom Verlag oder durch eine Buchhandlung bezogen werden. Der Bezugspreis beträgt im Abonnement pro Quartal (3 Hefte) 14,— DM einschl. Versandkosten. Das Einzelheft kostet 5,— DM zuzügl. Versandkosten. Kostenlose Probehefte liefert der Verlag auf Anforderung. Auslandsabonnements errechnen sich pro Jahr einschl. Versand auf der Basis von 15 $.

APARTADO

Reprinted from: BOLETIN CHILENO DE PARASITOLOGIA

Vol. XV — Octubre - Diciembre de 1960 — Nº 4

Loxosceles y loxoscelismo en América del Sur

III.— *LOXOSCELES LAETA* (NICOLET) 1849 NO EXISTE

WOLFGANG BÜCHERL

(Laboratorio de Zoología Médica, Instituto Butantan, Brasil. Trabajo realizado en Agosto de 1960, bajo los auspicios del F. P. I. B.)

Traducción del texto original al español por Dr. HUGO SCHENONE.

Summary

After revising Nicolet's original descriptions and having examined several dozen specimens of *Loxosceles* from Chile, it was concluded that:

1) Arachnologists had misinterpreted Nicolet's statements.

2) The species hitherto considered as *Loxosceles laeta* must from now on be referred to as *Scytodes laeta* Nicolet 1849.

3) The spider which causes Loxosceles poisoning ("Loxoscelism") in Chile is *Loxosceles rufipes* (Lucas) 1834.

I.—INTRODUCCION

Nicolet (1), en 1849, dividió las arañas del género *Scytodes* Latr. 1804, de la familia de las SICARIIDAE, en dos grupos: las "gibosas", con cefalotórax globuloso y convexo, y las "deprimidas", con dicho segmento bajo y deprimido.

En el segundo grupo colocó a la *Scytodes rufipes* Lucas 1834, y a dos nuevas especies, *Scytodes laeta* y *S. nigella*, describiendo un ejemplar hembra en cada uno de los tres casos. Estos 3 ejemplares habían sido capturados en Santiago de Chile, y probablemente deben haberse perdido.

Simon (2), en 1895, subdividió la familia en 6 subfamilias, e incorporó a las arañas "gibosas" en el género *Scytodes* de la sub-familia de las *SCYTONIDAE* y a las "deprimidas" en el género *LOXOSCELES* Heinecken y Lowe 1831 de la sub-familia de las *LOXOSCELINAE*. En 1907 (3) describió 3 nuevas especies, utilizando en cada caso

un macho solamente, la *Loxosceles spadicea* de Bolivia, *L. surata* de Brasil y *L. taeniopalpus* de Ecuador. Sin haber considerado las descripciones ni examinado los ejemplares de Nicolet, coloçó la *Scytodes rufipes, S. laeta y S. nigella* de Chile, conjuntamente con la *Loxosceles similis* Moenckhaus 1898 —un ejemplar macho procedente de Iguape, Estado de Sao Paulo, Brasil— en sinonimia con *laeta*, con el nombre definitivo de *"Loxosceles laeta"* (Nicolet) 1849.

Haciendo un análisis retrospectivo, llegamos a la conclusión de que, de ninguna manera, Simon estaba autorizado para considerar en sinonimia con *laeta* el ejemplar que Nicolet describiera con el nombre de *S. rufipes*, puesto que la descripción coincide, por lo demás, con la de *L. rufipes* (Lucas) 1834. Tampoco debería haber trasladado *Scytodes laeta* al género *Loxosceles*, puesto que, además de no haber examinado el ejemplar, tampoco había consultado el texto original, que se adapta totalmente al género *Scytodes* y no al *Loxosceles*. Le era menos permitido aun poner al *Loxosceles similis* en sinonimia con *laeta*. De ésta se conocía entonces sólo el macho del litoral paulista, distante a millares de kilómetros de Santiago de Chile y completamente diferente del ejemplar hembra que Nicolet bautizara como *Scytodes laeta*. La arbitrariedad de Simon se hace más evidente por no haber examinado el especimen de Moenckhaus, del cual este autor ni siquiera describió el palpo ni el bulbo copulador, que son de fundamental importancia en la clasificación de las *Loxosceles*.

Ante estas sinonimias, procedió a la distribución geográfica de la *"Loxosceles laeta"* —de la que sólo existía realmente un ejemplar único en la colección de Nicolet— haciéndola extensiva a Chile, Argentina, Perú, Sur de Brasil (el único ejemplar macho de Moeckhaus), Guatemala y México.

Impresionados por la autoridad del famoso aracnólogo francés, los autores posteriores pasaron a describir como *L. laeta* (Nicolet) ejemplares que tenían escaso parecido con el ejemplar típico.

En las redescripciones de las especies sudamericanas, Mello-Leitao (4), por ejemplo, en 1918, y principalmente cuando caracterizó los machos en 1934 (5), confundió *Loxosceles surata* y *L. rufipes* con *L. rufescens* (Dufour) 1820, y a *L. laeta* y *L. intermedia* sp. n. con *L. rufipes* (Lucas). Esto ya lo hemos demostrado en dos trabajos, que han sido entregados para su publicación.

Petrunkevitch (6) en 1911, Chamberlin (7) en 1920, Escomel (8) en 1929, Vellard (9) en 1936, Bonnet (10) en 1954 y Roewer (11) en 1956, asignan a la *Loxosceles laeta* para Chile, Perú, Uruguay, Argentina, Brasil y algunos países de América Central. Gertsch (12) en 1958, diagnosticó como *L. laeta* un macho y una hembra de América Central, completamente diferentes de la hembra descrita por Nicolet en 1849 y del macho tipificado por Moenckhaus en 1898.

Esta "confusión sistemática" fue causante de la introducción de *"Loxosceles laeta"* en la literatura aracnológica, como una de las especies más difundidas en la América del Sur y Central. También fue causa de su incorporación espectacular en la literatura médica de Chile, Uruguay y otros países, como agente causante del temible **"Loxoscelismo"**.

En realidad, la *Scytodes laeta* Nicolet 1849, de Santiago de Chile, es una araña **totalmente inofensiva!** La que provocaba y que aún provoca el **"Loxoscelismo"** local y general y los accidentes humanos fatales, mencionados en la literatura de Chile, Argentina, Uruguay, Brasil y de otros países sud y centroamericanos, es principalmente la *Loxosceles rufipes*, además de otras especies de este género.

II.— MATERIAL Y METODO

Hicimos la revisión de *"Loxosceles laeta"* a base de cerca de dos docenes de ejemplares de la colección aracnológica del Instituto Butantán, clasificadas por Mello Leitao, entre los años 1933 y 1938, como *L. laeta;* de un lote de *"L. laeta"*, enviado en 1951 por el Prof. Mackinnon, Director del Instituto de Higiene de Montevideo; un tercer gran lote de *"L. laeta"* de Montevideo, enviado por gentileza de la Dra. Lucrecia Zolessi, del Laboratorio de Entomología de la Facultad de Humanidades y Ciencias y de varias decenas de ejemplares de *"L. laeta"*, procedentes de las siguientes localidades chilenas: La Serena, Coquimbo, Tarapacá, Santiago —la zona típica de los especímenes de Nicolet— y Viña del Mar. Todas estas últimas fueron enviadas por gentileza de los doctores Amador Neghme, del Departamento de Parasitología de Santiago de Chile y Roberto Gajardo-Tobar, de Viña del Mar.

La mayoría de estos ejemplares —más de un centenar— machos y hembras adultos y juveniles, fueron comparados minuciosamente. Medimos la longitud y el ancho de los fémures, patelas, tibias, metatarsos y tarsos, de las patas y de los palpos, los bulbos y émbolos de los machos. Estudiamos el color, la pilosidad, los quelíceros, los ojos, el esternum y el labio.

III.— TEXTO ORIGINAL DE NICOLET

Es importante que el que se interese conozca las descripciones originales que, de los 3 especímenes de Chile, hizo Nicolet en 1849.

a) *Scytodes rufipes* Lucas:

"Corselete redondeado por los lados, en forma de cora-
" zón en su parte posterior, **encogido** *y casi cuadrado ácia*
" la cabeza, de color moreno rojizo, con los **surcos radiosos,**
" indicados por líneas amarillas, un hoyuelo longitudinal
" bastante profundo, casi glabro, y sólo con pelos a los la-
" dos, cubiertos, lo mismo que las patas y parte de los mus-
" los, por un polvo pardo, de aspecto terroso; mandíbulas
" casi verticales, morenas y llenas de pelos flavos; patas y
" palpos rojizos: las primeras glabras, excepto algunos lar-
" gos pelos de los muslos, y los segundos cubiertos de lar-
" gos pelos morenos; abdomen apenas más ancho que el
" corselete, amarillo y sedoso; esternón oval, **levemente**
" convexo, *poco velloso y amarillento, como las ancas. Lón-*
" gitud total, 4 líneas y media; el corselete, 2 líneas; las
" patas, 8 1/2 - 9 - 8 - 10 líneas".
"Chile, Guayana, Méjico y Guatemala".

b) *Scytodes laeta* sp. n.:

"Corselete y patas de un amarillo de ámbar: el primero " *cordiforme,* **bastante convexo,** *con el hoyuelo longitudi-* " *nal ancho y profundo, cubierto en los lados y por delante* " *de los ojos de pelos ralos y morenos; ojos verdosos,* " **rodeados de negro;** *las mandíbulas son rojas y los palpos* " *amarillos, y todos muy velludos; abdomen aovado, de un* " *pardo amarillento pálido y sedoso, con* **visos blancos,** " *velludo a los lados y en la parte anterior; las* **patas están** " **regularmente punteadas de moreno,** *y con pelos sólo en* " *la base de los muslos, en los tarsos y por bajo de las ro-* " *dillas: todo lo demás es glabro; los muslos reflectan un* " *tinte blanco sedoso. Longitud total, 5 líneas; el corselete,* " *2 líneas;* **las patas, 8 - 7 1/2 - 7 - 9 líneas".**

"Esta especie difiere esencialmente de la precedente por " *un abdomen más grueso, y sobre todo por la longitud* " *relativa de las patas; las del segundo par de* **S. rufipes,** " *son más largas que las primeras,* **sucediendo lo contrario** " **en la presente especie".**

c) *Scytodes nigella* sp. n.:

" *...longitud total, 3 lín.; el corselete, 1 lín.; las patas,* " *4½ - 5 - 4 - 6 líneas..."*

IV.— ESTUDIO DE LOS EJEMPLARES TENIDOS POR *"LOXOSCELES LAETA"*

Cefalotórax redondeado, casi dos veces menos alto que el abdomen, un poco más largo que ancho, cordiforme en su parte posterior, con el "cephalon" saliente y disminuyendo nuevamente en la frente. Depresión torácica longitudinal, profunda, más estrecha en los machos que en las hembras. Surcos irradiados, con hileras de pelos oscuros, que se observan con nitidez en ejemplares bien conservados. Los dos surcos que delimitan el cephalon por detrás, forma un triángulo agudo en los machos, un pentágono en las hembras, y un triángulo obtuso o un pentágono en los ejemplares juveniles. A lo largo de los bordes laterales del cefalotórax hay una orla de pelos oscuros. En el cephalon presenta 4 a 6 corridas longitudinales de pelos oscuros, un poco divergentes en la frente. Los 6 ojos son de color blanco, homogéneos, de tipo nocturno. Los medianos anteriores son generalmente los de mayor tamaño; los laterales anteriores más grandes que los laterales posteriores, o bien los tres pares son casi iguales. Una línea recta, tangente al borde anterior de los laterales anteriores, puede pasar muy por detrás del borde posterior de los medianos anteriores, o próxima a éste; solamente en casos rarísimos puede tocar también este borde. Clipeus cubierto de numerosos pelos.

Los quelíceros, vistos lateralmente, se presentan cónicos, con un área lateral glabra, ocupada por las innumerables trabeculillas paralelas que constituyen la "lira estridulante". En la cara anterior presentan numerosos pelos. Cuando éstos se desprenden, apenas se observan los puntos de inserción, que en ejemplares deficientemente conservados, parecen "escamas". Tienen una membrana transparente en la cara interna, que termina en una apófisis amarillenta en su extremo apical, sobre la que reposan los extremos de las dos garras.

El labio es más largo que ancho, de color rojo, con una orla anterior amarilla, unido al esternum por medio de una sutura a veces imperceptible. Las bases de implantación de los palpos también con puntas amarillas frente al labio, en la línea mediana. Labio y palpos cubiertos de pelos cortos oscuros, y de pelos largos, más ralos.

Esternum ligeramente convexo, un poco más largo que ancho, con el borde surcado por una línea angulosa, en la que se insertan las coxas de las patas, y cubierto por numerosos pelitos obscuros y por pelos negros más largos y ralos, dirigidos desde el centro hacia los lados.

Abdomen ovalado, más voluminoso en las hembras y más pequeño y alargado en los machos. Se presenta cubierto de pelos oscuros, que forman en el dorso y en los lados una cubierta vellosa y en la cara ventral otra cubierta, algo más rala. Esta cubierta está formada por numerosos pelitos en que se entremezclan pelos largos.

Las dos hiladoras inferiores y superiores son aproximadamente del mismo tamaño, en tanto que el tercer par es mucho menor. Cólulo digitiforme, grande y cubierto de cerdas, al igual que el tercer par de hiladoras. Los artículos terminales de las hiladoras inferiores se presentan en forma de un estrecho disco; los de las posteriores son más largos, pero siempre bastante menores que el artículo basal.

En la tabla siguiente se presenta las longitudes medias de los fémures, patelas, tibias, metatarsos y tarsos de las patas, calculadas sobre 12 ejemplares de machos y hembras adultos e igual número de ejemplares juveniles:

	fémur	patela	tibia	metatarso	tarso	mm: total
Machò						
Pata I	6,0	1,6	6,9	7,0	2,0	23,5
" II	7,0	1,7	7,3	8,0	2,0	26,0
" III	6,0	1,5	5,4	7,0	1,6	21,5
" IV	7,2	1,8	7,0	8,9	2,0	26,9
Hembra						
Pata I	6,1	1,6	5,9	5,8	1,6	21,0
" II	6,6	1,7	6,1	6,2	1,8	22,4
" III	6,0	1,6	4,9	5,6	1,5	19,6
" IV	7,2	1,8	6,3	7,5	1,8	24,6

Forma juvenil del sexo femenino						
Pata I	4,2	1,0	4,1	4,0	1,5	14,8
" II	4,6	1,1	4,4	4,4	1,6	16,1
" III	4,1	1,1	3,3	3,9	1,3	13,7
" IV	5,0	1,2	4,6	5,2	1,7	17,7
Forma juvenil, masculino, casi adulto.						
Pata I	5,5	1,6	5,4	5,4	1,7	19,6
" II	6,0	1,7	5,8	6,0	1,8	21,3
" III	5,3	1,5	4,6	5,7	1,4	18,5
" IV	6,5	1,6	6,0	7,6	1,8	23,5

Esta tabla comprende ejemplares procedentes del Estado de Sao Paulo (Cerqueira, San Carlos, Corubataí, capital de Sao Paulo, Pindamonhangaba), Estado de Santa Caterina (Lagoa) y Estado de Río de Janeiro (Barcelos); Montevideo, Uruguay (de los lotes del Prof. Mackinnon y de la Dra. Zolessi) y de Chile (Santiago, Coquimbo, Tarapacá, La Serena y Viña del Mar), correspondientes a los envíos del Prof. A. Neghme y Dr. R. Gajardo-Tobar.

En todos, sin excepción alguna, la fórmula de la longitud total de las 4 patas es: 4 — 2 — 1 — 3.

Los machos y las hembras, al igual que los ejemplares juveniles, pueden ser diferenciados por la **longitud del metatarso del 4º par** de patas en relación al fémur 4, escasamente más largo en las hembras y significativamente más largo en los machos.

Todos los artículos de las patas están cubiertos ralamente por pelos; cortos pelitos sedosos oscuros semitendidos, ordenados en filas longitudinales; y pelos más largos, de color casi negro, erectos y dispuestos en la segunda mitad de los fémures, en las tibias y en los metatarsos en 8 hileras longitudinales de admirable simetría. En los tarsos son substituídos por largas cerditas aserradas que envuelven el oniquio y parcialmente las garras. En todas las patas tienen dos largas garras curvas, de color negro, provistas de una serie de dientes. Estos dientes se presentan en número de 10 a 11 en los dos primeros pares de patas, de 7 a 8 en el tercero y de 4 a 5 en el cuarto par. Adherida al oniquio tienen una tercera garrita negra, muy pequeña y poco visible.

Los tarsos de los palpos de las hembras adultas y de las formas juveniles de ambos sexos no presentan garras.

Los machos adultos se distinguen fácilmente de las hembras por la presencia del **bulbo copulador** en los tarsos de los palpos, ausente en las hembras. Las longitudes y las anchuras de los fémures, patelas, tibias, tarsos, bulbos y émbolo, además de la ya vista fórmula general de las patas, son de decisiva importancia para la determinación de la especie. En la tabla siguiente se presenta la relación entre el largo y ancho de los palpos en machos de Brasil, Uruguay y Chile.

Longitudes y anchuras de los palpos de los machos: mm.

	fémur	patela	tibia	tarso	bulbo	émbolo
Cerqueira Cesar	3,9x0,4	1,2x0,5	2,5x0,9	0,5x0,5	0,4x0,4	1,5
Lagoa	3,7x0,6	1,3x0,7	2,3x0,9	0,5x0,5	0,4x0,4	1,2
Sao Carlos	4,0x0,5	1,0x0,5	2,7x0,9	0,7x0,7	0,4x0,4	1,8
Montevideo	3,8x0,4	1,3x0,3	2,7x0,9	0,8x0,8	0,5x0,5	1,6
	3,1x0,3	1,1x0,4	2,0x0,8	0,6x0,6	0,5x0,5	1,3
La Serena	3,5x0,4	1,3x0,5	2,1x0,8	0,8x0,8	0,4x0,4	1,8
	4,3x0,6	1,2x0,6	2,7x0,9	0,7x0,8	0,5x0,5	1,8
Santiago	3,9x0,6	1,3x0,7	2,5x0,8	0,7x0,7	0,4x0,4	1,9
	3,6x0,5	1,1x0,5	2,2x0,9	0,7x0,7	0,5x0,5	1,8
	1,9x0,5	1,0x0,7	1,1x0,6	1,6x0,8	Ejemplar juvenil sin bulbo.	
	4,4x0,4	1,1x0,6	2,4x0,9	0,7x0,7	0,5x0,5	1,4
Viña del Mar	4,0x0,4	1,0x0,4	2,5x0,8	0,8x0,8	0,6x0,5	1,6

Por lo tanto, la relación entre el largo y el ancho de los segmentos del palpo de los machos es de 8—10:1 en el fémur, de 1.8—2.1:1 en la patela; de 2.5—3:1 en la tibia, y de 1:1 en el tarso y el bulbo. El émbolo, incurvado, es cerca de dos veces mayor que la anchura del bulbo.

El color sólo puede ser apreciado al natural en ejemplares vivos o muertos recientemente. En éstos el dorso y los lados del abdomen son casi negros, debido al denso pelaje oscuro, pudiendo haber o no una estría clara, mediana, en la parte anterior del abdomen; el vientre de color ceniza oscuro, más amarillento que en el dorso. El cefalotórax de color amarillo castaño, más rojizo en la parte anterior y oscuro donde presenta pelos. Quelíceros de color ferruginoso. Labio y base de implantación de los palpos de color ferruginoso también, con una orla amarilla anterior; fémures, patelas y tibias de los palpos, de color amarillo en los machos y tarsos rojos, en las hembras ya las tibias y los tarsos son rojos; bulbo amarillo; émbolo ferruginoso en la punta. Esternum y ancas de las patas son amarillas, con pelos oscuros. Los fémures, las patelas y una parte de la base de las tibias son amarillo-verdosas, con pelos oscuros (en el lote de Santiago, en algunas hembras, se observó una mancha ferruginosa en la cara basal anterior de los fémures), los metatarsos y tarsos son de color ferruginoso.

En los ejemplares conservados en alcohol se suelen desprender principalmente pelos de las patas y del cefalotórax; lo mismo que se pierden los tonos de color ferruginoso de la quitina de la frente, de las tibias y tarsos de los palpos y de los metatarsos y tarsos de las patas, y a veces, también, del labio y de las bases de los palpos, apagándose cada vez más y dando lugar a un color amarillo uniforme. En los sitios en que había pelos largos, apenas subsisten los "orificios de inserción'.

Por este motivo, no se puede insistir en el color para diferenciar las especies de *Loxosceles,* ofreciendo, en cambio, la fórmula de la longitud de las patas y de los artículos de los palpos de los machos, como caracteres específicos seguros.

Medidas.— Hembras adultas: entre 10 y 14 mm. de longitud total; cefalotórax entre 4 y 5 mm., por 3.4 — 4.2 mm. de ancho.

Machos adultos: entre 7 a 12 mm. de longitud total. El largo de las patas en relación al largo del tronco es significativamente mayor en los machos que en las hembras.

Todos los ejemplares aquí estudiados, considerados como *"Loxosceles laeta"*, tanto del Brasil, como de Uruguay y de las diversas localidades de Chile, concuerdan, sin excepción alguna, con la fórmula de las patas: 4—2—1—3 y la fórmula de los palpos de los machos. Todos son, en realidad, *Loxosceles rufipes* (Lucas) 1834.

V.— DISCUSION DE LOS RESULTADOS

La *Scytodes nigella* de Nicolet es, de hecho, apenas una forma juvenil de *Scytodes rufipes,* y debe ser considerada sinónima con *Loxosceles rufipes* (Lucas).

Por otra parte, consideramos que el ejemplar que fue diagnosticado como *Scytodes laeta* por Nicolet, debe continuar con ese nombre (*S. laeta* Nicolet 1849), por las siguientes razones: presentaba un cefalotórax "bastante convexo", en tanto que en las *Loxosceles* este segmento es "deprimido"; las patas eran *regularmente punteadas de negro"*, en circunstancias que en todas las especies de *Loxosceles* las patas son de un mismo color y nunca con manchas negras regulares; y, finalmente, su fórmula del largo de las patas era de 8-7-5-7-9 líneas, mientras que en las *Loxosceles* jamás el 2º par de patas es más corto que el primero.

Los ejemplares de las localidades chilenas de La Serena, Coquimbo, Tarapacá, Viña del Mar y Santiago, los de Montevideo y de diversas localidades del Brasil, denominados hasta ahora *"L. laeta"*, deben llamarse *Loxosceles rufipes* (Lucas) 1834.

VI.— RESUMEN

Al examinar los textos descriptivos originales de Nicolet y varias docenas de ejemplares de *Loxosceles* de Chile, llegamos a las siguientes conclusiones:

a) Los aracnólogos interpretaron arbitrariamente a Nicolet.

b) La especie que hasta ahora era tenida como *"Loxosceles laeta"*, debe continuar con el nombre original de *Scytodes laeta* Nicolet 1849.

c) La araña causante del *"Loxoscelismo"* en Chile, es la *Loxosceles rufipes* (Lucas) 1834.

REFERENCIAS

1.—Nicolet.— En Gay: **Historia de Chile.** Imp. Moulde y Renou, París, **3:** 349, 1849.

2.—Simon.— **Hist. Nat. d'Araign,** 1: 273, 1895.

3.—Simon.— Ann. Soc. ent. Belgique, **51:** 246, 1907.

4.—Mello-Leitao.—Rev. Mus. Paulista, **10:** 123-144, 1918.

5.—Mello-Leitao.—An. Acad. Bras. Sci. Río de Janeiro, **6:** 69-79, 1934.

6.—Petrunkevitch.—Bull. Amer. Mus. Nat. Hist., **29:** 118, 1911.

7.—Chamberlin.—Bull. Brookl. Inst. Art. Sci., **ser. 2, 3:** 40, 1920.

8.—Scomel.—Obras Científicas, Lima, **1:** 377, 1929.

9.—Vellard.—**Le venin des araignées,** Masson et Cie. París, 269, 1936.

10.—Bonnet.—Bibliographia araneorum, **2(3):** 2574, **1954.**

11.—Roewer.—Katalog der Araneae, **1:** 320, 1956.

12.—Gertsch.—Am. Mus. Novitates, **1907:** 38-39, 1958.

Agradecimientos: Agradecemos la valiosa colaboración de los profesores Mackinnon, Director del Instituto de Higiene de Montevideo y Amador Neghme, Director del Instituto de Biología de Santiago de Chile; y de los doctores Lucrecia Zolessi, de Montevideo y Roberto Gajardo-Tobar, de Viña del Mar, Chile.

Reprinted from: Ciência e Cultura, 13 (4):213-224, 1961

Aranhas do gênero *Loxosceles* e *Loxoscelismo* na America

Wolfgang Bücherl

(Laboratório de Zoologia Médica, Instituto Butantan, C. P. 65; São Paulo, Brasil)

(Trabalho apresentado na XII Reunião Anual da S.B.P.C., em Piracicaba, em julho de 1960)

I. CONSIDERAÇÕES GERAIS:

Entre milhares de espécies de *aranhas* das 2 subordens — Caranguejeiras (ORTHOGNATHA) e Verdadeiras (LABIDOGNATHA) — existem poucas que, por sua incômoda frequência, pronunciada agressividade ou pela poderosa ação de seu veneno, têm despertado o interesse dos médicos clínicos, biólogos e estudiosos das peçonhas.

Entre as últimas figuram: o gênero *Ladrodectus*, família THERIDIIDAE (*L. mactans*, *L. geometricus*, *L. tredecimguttatus*, *L. hasselti*, etc.), relativamente comum no oeste dos Estados Unidos, ao longo dos Andes na America do Sul, em torno da bacia do Mediterrâneo, dos mares Cáspio e Negro, na Australia e em certas regiões africanas; representantes do gênero *Phoneutria* (CTENIDAE), encontradas no Estado de São Paulo, inclusive na Capital, no Rio de Janeiro e Espírito Santo; cerca de uma dúzia de espécies do gênero *Lycosa* (LYCOSIDAE), muito frequentes nos climas subtropicais dos planaltos brasileiros, também em torno da Capital de São Paulo, das planícies do Rio Grande do Sul e uruguaio-argentinas; diversos especimens do gênero *Loxosceles*, da família das SICARIIDAE, objeto dêste estudo.

Enquanto que, no que diz respeito aos primeiros três gêneros, existissem já estudos sôbre sua sistemática, biologia, a natureza dos venenos e sua ação em pessôas acidentadas e os clínicos já tivessem à mão sôros específicos ou polivalentes para socorrer os gravemente intoxicados, tudo faltava ainda, até há pouco, no tocante a *Loxosceles*. Dispúnhamos sómente de publicações de natureza clínica, com alguns ensaios experimentais das peçonhas, a revelar, antes de tudo, a inoperância dos sôros anti-aracnídicos até então existentes, a denunciar um quadro de envenenamento todo particular, desde uma pequena necrose cutânea ou perdas de tecido superficial mais substanciais até hemoglobinúrias graves, com lesões agudas nos rins e no fígado, que podiam terminar na morte do paciente entre o 2.º e 8.º dias após a picada e a apelar, tanto no Chile como no Uruguai, na Argentina e nos Estados Unidos da América do Norte, para que finalmente alguém ou alguma instituição produzissem um *sôro especifico* contra o *Loxoscelismo*.

II. PUBLICAÇÕES SOBRE LOXOSCELISMO:

A *sintomatologia* dos acidentes e preciosas indicações sôbre a própria aranha nos foram reveladas pelas publicações clínicas, feitas desde os fins do século passado até os dias de hoje. Constituem observações espontâneas e independentes, sem que os autores tivessem sabido, na maioria das vezes, que o mesmo problema existia também em outros países.

Primeiro descreviam o efeito — a ferida necrótica na pele humana ou "mancha gangrenosa". Depois desconfiavam de um "inseto" venenoso, como possível causador. Finalmente falavam em uma *aranha pequena*, de colorido sombrio, que residia dentro das próprias habitações humanas ou em torno delas. Apenas muito mais tarde pôde ser identificada, como sendo *Loxosceles laeta* no Chile e Perú, *L. rufipes* na Argentina e no Uruguais, *L. rufipes* e *L. rufescens* no Brasil e *L. reclusa* no Oeste dos Estados Unidos da América do Norte.

No Chile foram descritas por Gusman(1), em 1894, chagas na pele humana, atribuídas provàvelmente a "insetos pozoñosos". Matus(2) caracterizou, em 1926 a "mancha gangrenosa" e Tirado(3), em 1931, acusou a uma aranha como responsável pelo "*aracnoidismo cutâneo-gangrenoso do Chile*". Escudeiro(4) publicou um acidente *fatal* e Gallinato(5) apresentou "enfermos de aracnoidismo" perante uma junta médica.

Macchiavello(6-11), empolgado pelo importante assunto, apresentou, durante os anos de 1934 a 47, o histórico clínico de cerca de uma centena de pessôas acidentadas; descreveu o sindroma do envenenamento desde os casos leves, de repercussão local apenas, até fatais; capturou algumas aranhas, enviou-as a especialistas no Brasil e nos Estados Unidos da América do Norte e recebeu a resposta, de que se tratava de *Loxosceles laeta*. Em ensaios experimentais fez com que algumas aranhas mordessem ratos e coelhos e com o veneno, obtido de extratos glandulares,

injetado em animais de laboratório, comprovou que, de fato, esta pequena e insignificante aranha era a responsável pelo *"arañismo cutáneo-gangrenoso y hemolitico do Chile"*.

Os trabalhos de DONOSO-BARROS(12), em 1948, de BERTIN(13), em 1950, de MENEGHELLO e EMPARANZA(14), em 1952, insistiam sôbre a extraordinária *gravidade* de certos acidentes humanos, raros embora e sôbre a relativa frequência no Chile dos quadros clínicos menos graves, com necroses cutâneas.

Segundo SCHENONE(15), em 1953, a "araña de los rincones" (*Loxosceles laeta*)..." es una especie casera que existe en Chile desde Tarapacá a Talca. Habita en las paredes de las casas viejas, de preferencia en los rincones, grietas, debajo de los cuadros... A veces se coloca debajo o entre las ripas colgadas en las paredes... No ataca espontaneamente al hombre y solo lo muerde, inyectandole su veneno, cuando se cre atacada..." Segundo a quantidade de veneno injetado sobresai no paciente o quadro clínico meramente local ou uma intoxicação geral de maior ou menor gravidade. No primeiro caso há, 30 a 60 minutos depois da picada, uma *zona eritematosa* com uma *flictena* no centro. Após algumas horas aparece um *edema duro*, circumscrito, de extensão variável. A esta altura o indivíduo pode sentir dôr pungente, certo mal estar, nervosismo, elevação térmica. 48 horas após o centro escurece e se transforma lentamente em *escara*. Esta elimina-se depois de vários dias, deixando a descoberto os tecidos subjacentes. A cicatrização é lenta. Segundo a quantidade de veneno injetado, a natureza do local e a sensibilidade do paciente, pode haver uma série de variações dêste "loxoscelismo local" quanto à dôr, extensão da chaga, permanência da necrose e comprometimento de tecidos mais profundos.

"...Pero hay ocasiones, por fortuna poco frecuentes, en que el cuadro puede adquirir inusitada intensidad...y se agrega grave compromiso general e de los parénquimas renal y hepático, con un síndrome hemoglobinurico... Hay una profunda intoxicación general, se presentam nauseas, vómitos, cefalea, hipertermia, sudoración, subicterícia o icterícia...y hemoglobinuria intensa con albuminuria. Antes que la lesión cutánea alcance su completa evolución, suele producirse la *muerte por bloqueo renal*, debido al acúmulo de hemoglobina en los túbulos renales y a hemorragias viscerales..."

Lamentando vivamente a ausência de *sôros especificos*..."de los cuales desafortunadamiente no se dispone en el país...", estabelecia o autor o seguinte esquema de tratamento: Vaso-dilatadores; compostos de ácido nicotínico em comprimidos, em doses diárias de 100 mg 4 vézes para adultos e de 50 mg 4 vezes para crianças, aplicações de ultradermia de 15 a 20 minutos de duração nos primeiros 5 a 8 dias, transfusões, hidratação com sôro glicosado, sedantes e analépticos e 200 mg diários de cortisona nos primeiros 3 dias e 100 mg nos dias seguintes.

PRATTS e SCHENONE(16) se referiram, em 1957, à captura de 84 exemplares de *L. laeta* em torno de uma única casa velha..."y, cosa curiosa, nunca se había registrado un acidente entre los moradores".

Quanto ao *prognóstico* dos acidentes humanos, a onga experiência lhes ditara detalhes clínicos tanto mais importantes, quanto é sabido que os pacientes só costumam procurar auxílio médico horas após o acidente e sem trazerem consigo, geralmente, a causadora do acidente ou sem suspeitarem mesmo de que se tivesse tratado de uma aranha:"... Enquanto a urina apresentar aspecto *normal*, qualquer que seja a extensão do processo local, se trata geralmente apenas de um quadro local, sem maior perigo... "Es la presencia de *anuria* o de urinas de *aspecto hematúrico*, manifestaciones que, por lo general, son precoces e indican la gravedad del proceso...", que deve fazer temerem-se complicações graves.

No Uruguai houve descrições de gangrenas cutâneas, em 1936, por RIBEIRO-RIVERA(17) e por MAY(18), sem que ficasse conhecida então a sua causa. VOLPE e BARBERROUSSE(19) publicaram, em 1938, o falecimento de uma criança de 11 anos 36 horas após a picada por uma aranha. No mesmo ano verificou-se a descrição de 3 acidentes por "arañismo cutáneo-gangrenoso y hemolítico", por MACKINNON(20) e de mais outros 6 por COSTA e SALVERAGLIO(21), em 1939 e mais 4 por COSTA, BREA e colaboradores(22). STAJANO(23) descrevia, em 1945, um acidente com "extensa y profunda necrosis de la piel", causada provàvelmente por "picadura de inseto no determinado".

Sómente em 1948 conseguiu MACKINNON(24) apreender 2 aranhas, que tinham mordido pessôas e receber a determinação de que se tratava certamente de *Loxosceles* e provàvelmente de *L. laeta*. (De fato, fôra *L. rufipes*). Estabelecida, daí por diante, a relação entre a causa e o efeito, houve repetidas tentativas por COSTA e SALVERAGLIO(25) e COSTA(26), em 1949, principalmente porém por ARROYO e WITKIND(27), em 1951, WITKIND(28), em 1953, MACKINNON e WITKIND(29), focalizando o Loxoscelismo na própria Capital uruguaia e seus arredores: "...Una pequeña y aparentemiente inofensiva *araña domiciliuria*, muy comum en los edificios modernos y antigos de Montevideo, galpones, viviendas rusticas... es causante del *aracnidismo necrotico*..."

MACKINNON julgou o problema mais importante para o Uruguai do que o das serpentes venenosas; ensaiou os sôros anti-aracnídicos do Instituto Butantan, sem resultado; tentou a imunisação de coelhos com o veneno de *Loxosceles*: "...Si se desea hacer terapeutica especifica contra el aracnidismo necrótico en el Uruguai, sería necesário disponer de un suero anti-loxosceles, que...del punto de vista práctico ofrece grandes dificuldades en la actualidad, pues grandes cantidades de arañas serían necesárias para obtener sueros realmente efectivos..."

Para os autores argentinos o "inseto" ou a aranha era "de pequeña dimensión", DELIO AGUILAR(30), em 1908, "un pequeño inseto, que resultó ser una araña", SOMMER e GRECCO(31), em 1910, "escura, casi negra, pequeña", DEL PINO(32), no mesmo ano, "negra y pequeña", SOLARI, em 1911, causadora do "arañismo íctero-hemolítico", MAZZA(33), em 1911, "cutáneo-íctero-hemolítico", GRECCO(34), em 1914.

Êstes trabalhos pioneiros sofreram abrupta influência pela autoridade de HOUSSAY(35), em 1918, mais tarde pelas pesquisas de VELLARD(36), em 1936, que, em nenhum veneno aracnídico ensaiado, tinham podido encontrar, com os métodos usados, ação hemolítica direta.

Um fato deveras insólito aconteceu em 1944 a IBARRA GRASSO(37): Embora soubesse de 12 mortes humanas na Argentina, devidas..."a una araña *misteriosa*, obscura y de pequeño tamaño,' produtora de esos cuadros clínicos terminados a menudo con la muerte o causante del cuadro íctero-hemolítico y única responsavel de todas las muertes causadas por picadura de araña en el país...", e se visse forçado por isto a apelida-la de *"araña homicida"* e tivesse que constatar ainda sua frequência em Buenos Aires, "...es evidentemiente una araña que se encuentra cômoda en la ciudad"..., e embora, durante 8 anos, tivesse submetido seu próprio corpo — as mãos e os dedos — a cerca de 100 picadas por 12 espécies de aranhas de gêneros diferentes, inclusive mesmo a famosa *Loxosceles rufipes* (a procurada justamente!), não conseguiu constatar — felizmente para ele — com nenhuma delas o procurado quadro sintomático grave, da hemoglobinuria e icterícia.

Certamente imune já em elevado grau pela incorporação successiva de 12 antígenos aracnídicos diferentes, "mal" mordido pela *Loxosceles rufipes* — a experiência ocorrera no tempo frio e "...uma gota relativamente grande del veneno..." se perdera sôbre a pele — nada pôde assinalar em si, há não ser um *edema persistente* e "várias escaritas definidamente necróticas" com cicatrização definitiva sómente depois de 70 dias.

O veneno de *L. rufipes* era para ele pois apenas "...simples acción local cutánea, necrosante", à semelhança do das espécies de *Lycosa*. Continuava "misteriosa" a aranha "homicida" de Buenos Aires, embora não possa haver dúvida, de que ela seja justamente a *L. rufipes*.

Em Kansas e Missouri dos Estados Unidos da América do Norte apontavam-se em periódicos médicos locais *necroses na pele* humana, causadas por picadas de "insetos" ou aranhas, principalmente por uma aranha pequena, marron, que se encontrava nas vestes dos pacientes e que só mordia, quando era contundida contra o corpo humano.

"...A thick wheal usually forms with *necrosis* of tissues at the immediate side of the punctures made by the chelicerae. The necrotic area soon turns *violaceous*, than *black* and *dry*... or may persist for several weeks and healing takes place very slowly", escreveram ATKINS, WINGO e SODEMANN(38), em 1957. Já em 1929, SCHMAUSS(39) se tinha referido a uma "...significantly poisonous spider in Kansas", determinada, em 1940, por GERTSCH and MULAIK(40), como sendo *Loxosceles reclusa*. WEINER, STOPPER, CHORNOCK e YOUNG (41) publicaram, em 1960, a história clínica de uma menina de 6 anos, com *hemólise intravascular aguda*, devida à inoculação do veneno por um pequeno aracnídeo caseiro.

No Brasil não tem havido publicações clínicas sôbre Loxoscelismo. Os médicos do Hospital Vital Brazil do Instituto Butantan, entretanto, constatavam, de 1942 para cá, um ou outro acidente humano por aranha não determinada, semelhante aos determinados por aranhas do gênero *Lycosa*, embora mais graves, com lesões cutâneas mais profundas e extensas. Em 2 dêstes conseguimos determinar a *Loxosceles rufipes* como responsável.

Em 1952(42) injetamos extratos glandulares de *L. rufipes* e de uma outra espécie, então por nós chamada de *L. laeta*, em camundongos, pombos, cobaios e coelhos, por via venosa, intramuscular e intradérmica (na orelha). A quantidade de veneno, correspondente a 2 glândulas, de ambas as espécies, determinava sempre perfuração total da orelha do coelho ou do camundongo.

Pouca ação foi constatada, quando o veneno era injetado na veia ou intramuscularmente. Julgamos, então, que entre nós difícilmente haveria um loxoscelismo grave; os acidentes humanos seriam raros e meramente com repercussão local.

III. ESPÉCIES SUL-AMERICANAS:

Entre as espécies sul-americanas de *Loxosceles* Heinecken e Lowe 1832 há uma *cosmopolita*, outras difundidas por diversos países sul-centro e norte-americanos e um terceiro grupo de distribuição local apenas.

1) *Morfologia do gênero*:

As fêmeas adultas atingem entre 8 e 16 mm de corpo e 19 a 27 mm de comprimento de pernas e os machos 6 a 11 e 20 a 34 mm respectivamente (Foto n.º 1). O *abdomen* é oval, cinza-escuro, nas fêmeas, mais alongado e estreito nos machos. O *cefalotorax* é baixo, mais deprimido atrás que na frente e duas vêzes menos elevado do que o abdomen. A *fóvea torácica* é longitudinal, em fenda estreita ou ovalada. Na metade anterior do cefalotorax eleva-se a porção cefálica que atinge sua maior altitude na região ocular, decaíndo obliquamente na fronte em direção às quelíceras. 6 *olhos* homogêneos, do tipo noturno, estão dispostos em 3 díadas, ocupando a díada dos M. A. o meio da fronte. Da fóvea torácica partem *estrias irradiantes*, sendo as 2 que delimitam o "cephalon" as mais nítidas. O *lábio*, considerado "imóvel" por uns, "móvel" por outros autores, mais longo que largo, arredondado em frente, com uma reentrância em cada lado, alarga-se novamente em sua base, em frente ao esterno. Os lobos maxilares dos *pedipalpos* amoldam-se à forma do lábio, rodeiam-no, ultrapassam-no e se encontram em sua frente, na linha mediana. As *fimbrias* do lábio e dos pedipalpos são amarelas. O *esterno*, pouco mais longo que largo, tem a margem externa recortada em outros tantos cantos agudos, quantas são as coxas das pernas e termina atrás em ponta, que alcança o meio do 4.º par de coxas. As *quelíceras* (Figura 1) são mais longas que largas, fundidas à altura do terço basal, separadas depois, com membrana transparente nos 2 lados internos e terminam apicalmente numa ponta interna espessamente quitinisada e que serve de ponto de apoio aos 2 pequenos *ferrões*, bastante curvos mas agudos. Não há "côndilo". A face lateral, externa, das quelíceras apresenta uma *"lira estridulatadora"*, em machos e fêmeas, representada por delicadas séries paralelas de trabéculas. A esta "lira" corresponde um *"pino estridulador"*, localisado na face interna, basal, do femur dos palpos (Figura 2 - no femur). Perto da ponta de cada ferrão aflora o canal de veneno, que percorre entre feixes musculares flexores e extensores o interior dos ferrões e do artículo basal das quelíceras, localizando-se o corpo das 2 *glandulas veneniferas* dentro do cefalotorax (Figura 1).

Fotografia N.º 1: *Loxosceles rufipes*- 3 fêmeas;

No ventre há um par de *pulmões*, colocado nos lados do sulco epigástrico e 1 microscópico *espiráculo traqueal* posterior, perto da base das 6 fiandeiras. Sem cribelo e calamistro. Genitalia das fêmeas do tipo "*haplógino*", isto é, sem estrutura externa alguma.

"*Cólulo*" em forma de cone digitiforme, muito longo, ornado de robustas cordas. *Fiandeiras* inferiores e superiores aproximadamente do mesmo comprimento, bisegmentadas, sendo o segmento apical das inferiores constituido por um estreito disco apenas e o das superiores por um cone curto. O par de *fiandeiras medianas* é pequeno, menor mesmo que o cólulo e se situa ao mesmo nível do par superior. É coberto por numerosas cerdas.

Palpos das fêmeas e dos jovens de ambos os sexos sem garras nos tarsos. Em machos adultos é o *bulbo copulador* do tipo simples, isto é, constituido por um orgão redondo que termina em um *êmbolo* encurvado ou serpentiniforme (Figura 2).

Os 4 pares de *pernas* são direitos, inseridos no esterno um tanto lateralmente, a permitir que a aranha repouse com as mesmas encolhidas. Os tarsos terminam em 2 *garras* pretas, robustas, com *denteação uniseriada*. O número de dentes é de 9 a 11 nas pernas anteriores, de 8 a 10 no segundo par, de 6 a 8 no terceiro e de 4 geralmente no último par, podendo haver pequenas variações no número em uma mesma população.

Os *revestimento piloso* consiste apenas em 2 tipos de pêlos: pelinhos curtos, delicados, escuros ou quási pretos, orientados em uma direção, cobrem densamente o abdomen, principalmente as faces laterais e dorsal. No esterno, no cefalotorax e no lábio são mais ralos. No cefalotorax podem formar fileiras longitudinais em direção aos olhos. Podem ainda condensar-se nos lados e formar em cada face "manchas" escuras, simétricas, a deixar livre no centro uma área "estrelada" mais clara. Os mesmos pelinhos encontram-se ainda nas pernas, nos palpos e na face superior, externa, das quelíceras.

O segundo tipo de pêlos é mais longo e robusto e existe principalmente nas 8 pernas, onde chega a formar 8 fileiras longitudinais, de incomum simetria, principalmente nas tíbias e nos metatarsos, mas também ainda na parte apical dos fêmures e basal dos tarsos. Na metade distal dos tarsos há cerdinhas serrilhadas, mais longas, a encobrirem parcialmente as garras e o *onículo*. São empregadas na feitura do tecido "floconoso", característico para as espécies dêste gênero.

O *colorido* é em todas as espécies do gênero de "desesperadora" monotonia: Onde os dois tipos de pêlos forem mais ralos, transparece o *amarelo sujo* da quitina (no esterno, ventre, nas coxas das pernas e dos palpos, nas fímbrias do lábio e dos palpos) ou o *vermelho-ferruginoso*, onde a quitina fôr mais espessa (na região ocular, na fronte, nas

quelíceras, nos metatarsos dos palpos). Sómente onde houver densa cobertura pilosa, aparece o colorido *cinza-escuro* (no abdomen, nas pernas e às vezes nos lados do cefalotorax).

Poucos meses de conservação em alcool determinam em geral o progressivo esmaecimento dos pêlos escuros. Mesmo tons ferruginosos da quitina desaparecem; os pêlos longos e, finalmente, os pelinhos curtos se desprendem total - ou parcialmente, sobrando ao taxonomista, que trabalha apenas com material conservado, uma aranha "nua", monótona, inteiramente amarela, qualquer que seja a espécie.

Sob estas premissas causa espécie que os aracnologistas, dispondo em geral de apenas um único exemplar, muitas vezes longamente conservado, tenham podido descrever nada menos de cerca de 40 espécies diferentes de *Loxosceles*!

2) *Descrição de Loxosceles rufescens* (*Dufour* 1820 e *L. rufipes* (*Lucas*) 1834:

Loxosceles rufescens, a espécie mais antiga, genotípica, foi descrita por DUFOUR, à mão de 1 macho, capturado em Valença, na *Espanha*. O tipo está perdido. Em épocas e por autores diferentes foram diagnosticados machos e fêmeas, de Portugal, das Ilhas dos Açores e das Canárias, do Egito, da Asia e de Madagascar. CHAMBERLIN encontrou-a, em 1916, em dois locais do *Perú* e julgou então que esta espécie seria comum em ambos os hemisférios americanos. Em 1920(43), porém, se desdisse e desde então está sumida para os sistemáticos esta espécie tão bem definida, entrando em seu lugar uma porção de espécies novas no subcontinente sul-americano. GERTSCH (44) julgou em 1958, que esta espécie tivesse sido trazida da Europa para a America do Norte, onde se pôde espalhar ao longo da costa do Atlântico no sul dos Estados Unidos e provavelmente também pela América Central e do Sul.

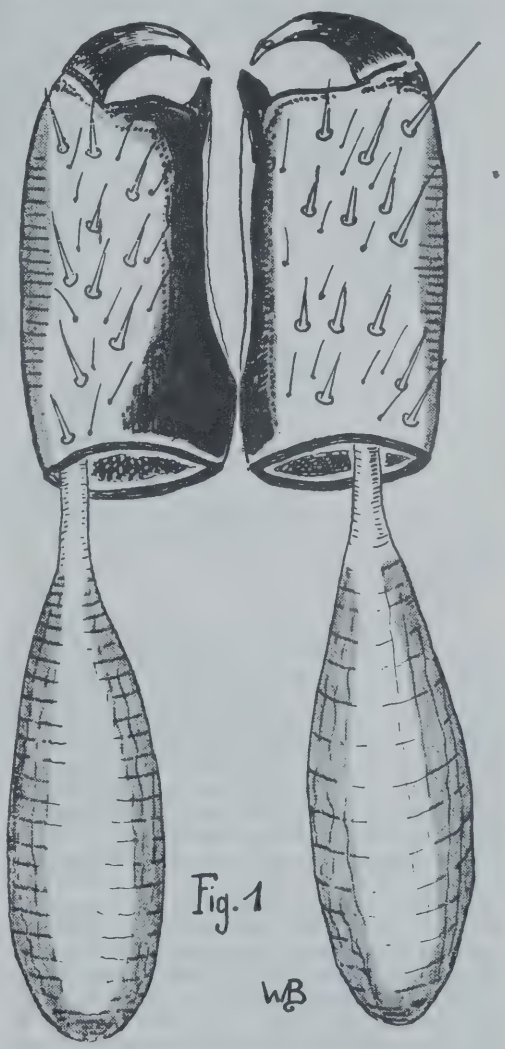
Embora tida até agora como inexistente na América do Sul, conseguimos apreender, em 1960, cerca de 1000 exemplares de *L. rufescens* machos, fêmeas e especimens ainda não adultos nos próprios terrenos do Instituto Butantan, em Cotia, no Morumbí, Caxingui, na Casa Verde, no Alto da Lapa, em Pirituba, Taipas e em Atibaia. Reestudando a coleção aracnológica, encontramos ainda algumas duzias de *L. rufescens*, determinadas entre 1934 e 1938 por Mello-Leitão, ora como *L. rufipes* ora como *L. surata*.

Com uma parte dêste abundante material reestudamos esta espécie. Comparamos os palpos e os bulbos copuladores dos machos. Realizamos centenas de medições dos artículos das pernas e dos palpos. Aferimos a posição e as dimensões dos olhos, a disposição dos pêlos na região cefálica e a forma da mesma e conseguimos fixar em definitivo a seguinte diagnose específica para *L. rufescens*: (Figuras 2 e 3):

a) O 2.º par de pernas é, em machos e fêmeas, significativamente mais longo do que o 1.º e o 4.º par (Figura 3).

b) O 1.º par é geralmente um pouco mais longo que o 4.º. Raras vezes os dois são do mesmo comprimento.

c) Em machos adultos é o *femur* dos palpos cêrca de 4 vêzes mais longo que largo, a *patela* tão longa como larga ou apenas um pouco mais longa que larga, a *tibia*, muito inflada, apenas um pouco mais longa que larga ou tão longa como larga, o *tarso* bem mais longo que largo, inserindo-se o bulbo na metade basal, lateralmente e o *êmbolo* é retorcido em serpentina, alcançando cerca de duas vezes o comprimento do bulbo (Figura 2-a).



Loxoceles rufescens: gnelíceras e glandulas de veneno

d) O metatarso do 1.º par de pernas do macho é direito.

e) Na maioria das populações estudadas há no cefalotorax uma figura simétrica de 6 manchas escuras laterais, com uma área central, estrelada, amarela.

As dimensões e a posição dos olhos e a curvatura da 1.ª fila ocular e todo o resto está sujeito a grandes flutuações tanto de uma população à outra como dentro da mesma população, não merecendo, por isto, valor específico.

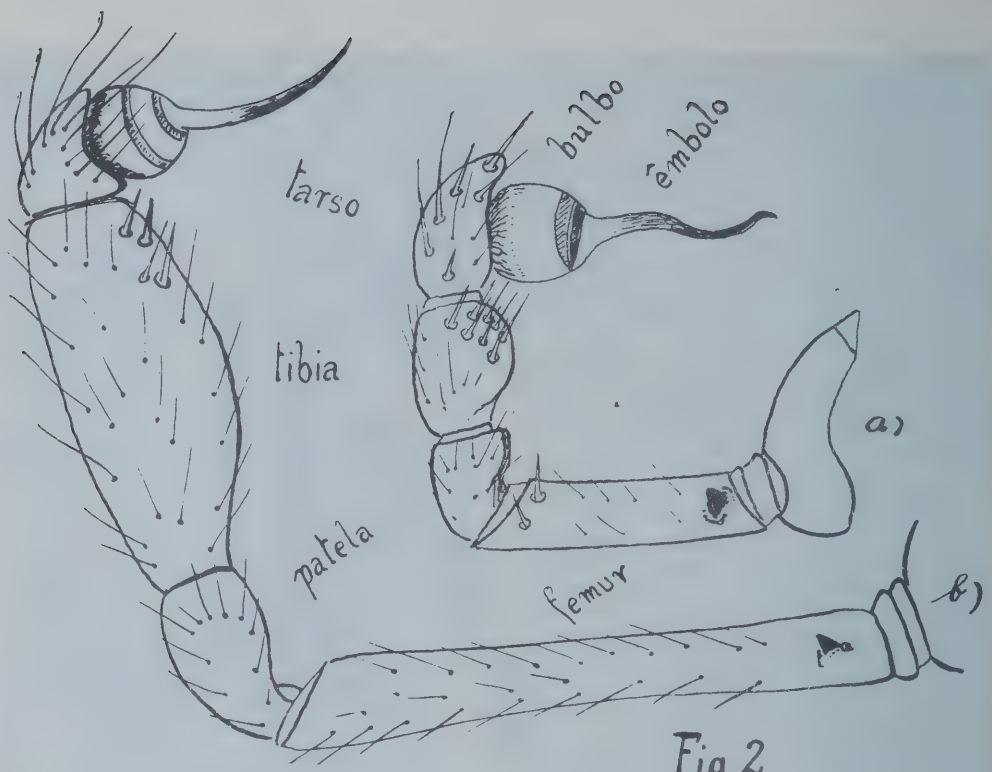


Fig. 2

Valores médios de comprimento e largura do palpo		
Femur	1,7-2,1 mm	0,4-0,5 mm
Patela	0,4-0,6 mm	0,4-0,5 mm
Tíbia	0,8-1,1 mm	0,6-1,0 mm
Tarso	0,8-1,0 mm	0,5-0,7 mm
Bulbo	0,5-0,6 mm	0,5-0,6 mm
Êmbolo	1,0-1,3 mm	

Loxosceles rufipes (Lucas) 1834 foi descrita do *Panamá*. NICOLET(45) assinalou-a, em 1849, em Santiago do *Chile*. Diversos autores recolheram-na em diferentes países da América Central e das Antilhas. MOENCKHAUS(46) mencionou, em 1898, um exemplar, capturado no Ipiranga, Capital de São Paulo. Mello-Leitão(47 e 48) mencionava esta espécie em suas revisões do gênero, feitas em 1918 e 1934. Na prática, porém, julgou-a inexistente entre nós, pois tanto na Coleção aracnológica do Museu Nacional no Rio de Janeiro como na do Instituto Butantan, estudadas por êle nos anos de 1934-1938 e por nós, em anos posteriores, confundiu esta espécie com *L. laeta*, *surata* ou *hirsuta*.

L. rufipes é frequente em torno de *Buenos Aires* (37) e em *Montevideo*. Do último local recebemos 2 remessas substanciais de exemplares vivos, a primeira em 1951 por gentileza do prof. Mackinnon e a segunda, em 1960, da dra. Lucrecia Zolessi. Ainda em 1960 conseguimos obter material do *Chile*, de Viña del Mar, por gentileza do prof. Cajardo Tobar, de Talca, Tarapacá, Santiago e La Serna pelos doutores Amador Neghme e Schenone.

Nos últimos mêses conseguimos apreender cerca de 1.400 exemplares desta mesma espécie no terreno do Instituto Butantan, na Fazenda do Butantan, perto de São Roque, no Morumbí, na região de Santo Amaro, na Cantareira e em Tremembé. Na coleção do Instituto Butantan há exemplares de Francisco Sodré, Cerqueira Cesar, São Carlos, Pindamonhangaba no Estado de São Paulo, de Riacho da Cruz em Minas Gerais e de Santo Angelo no Rio Grande do Sul.

Submetendo êste copioso material aos mesmos testes e medições, feitas com a espécie anterior, conseguimos estabelecer a seguinte diagnose para *L. rufipes*:

a) O 4.º par de pernas é em machos e fêmeas o mais longo.

b) O 1.º par é mais curto do que o 2.º (Figura 3).

c) Em machos adultos é o *femur* cerca de 8 a 10 vezes mais longo que largo, a *patela* 2 vezes mais longa que larga, a *tibia* quasi 3 vezes mais longa que larga, o *tarso* tão longo como largo ou mesmo um pouco mais largo que longo, inserindo-se o bulbo apicalmente. O *êmbolo* é 2 vezes mais longo que a largura do bulbo, em curva simples e não serpentiniforme (Figura 2-b).

Valores médios do comprimento e largura do palpo		
Femur	3,6-4,2 mm	0,4-0,5 mm
Patela	1,0-1,3 mm	0,5-0,6 mm
Tíbia	2,2-2,8 mm	0,8-1,1 mm
Tarso	0,5-0,6 mm	0,6-0,6 mm
Bulbo	0,5-0,6 mm	0,5-0,6 mm
Êmbolo	1,0-1,3 mm	

d) Metatarso do 1.º par de pernas nos machos um pouco flexuoso.

e) Cefalotorax concolor; pernas marron escuras.

L. rufescens e *L. rufipes* são fàcilmente identificáveis, como se pode ver na tabela seguinte:

L. rufescens e *L. rufipes* são fàcilmente identificáveis, como se pode ver na tabela seguinte:

Diagnose diferencial	*L. rufescens*	*L. rufipes*
Comprimento do 1.º, 2.º e 4.º par de pernas	2 - 1 - 4	4 - 2 - 1
Articulos do palpo do macho :		
Comprimento e largura :		
a) femur	4 : 1	8-10 : 1
b) patela	1 : 1	2 : 1
c) tíbia	1,1 : 1	2,5 : 1
d) tarso	1,8 : 1	1,0 : 1
e) êmbolo	serpentiniforme	curvo

3. *Revisão das outras espécies sul-americanas*:

a) *Loxosceles lutea* KEYSERLING 1877(49), de Bogotá, *Colombia*. O autor teve em mãos um lote de 6 fêmeas, não adultas. O macho é desconhecido até hoje. Do diagnóstico sobresai a fórmula das pernas, em que o 2.º e 4.º par seriam do mesmo comprimento (14,8 mm) e o 1.º par mais curto (14,2 mm). Esta fórmula nova justificaria esta espécie, que deverá ser redescrita mais minuciosamente. Sua aceitação dependerá da diagnose que será feita do macho.

b) *L. pictithorax* STRAND 1914(50), também de Bogotá, na *Colombia*. A espécie, descrita sôbre um único exemplar apenas, uma fêmea, e assim mesmo sem ter sido comparada com *lutea*, é indubitavelmente a mesma de Keyserling, devendo ser colocada em sinonimia com esta.

c) *L. taeniopalpus* SIMON 1907(51), do *Ecuador*, é uma nova espécie, da qual só se conhece até hoje um único exemplar, macho; a descrição foi sumária apenas, sem medidas das pernas. Pelo desenho do palpo poderia pensar-se em *rufipes*.

d) *L. longipalpis* BANKS 1908, das Ilhas dos *Galapagos*, é espécie muito duvidosa. Só foi descrita uma fêmea. Não se conhece o macho.

e) *L. accepta* e *L. nesophila* CHAMBÉRLIN(43) 1920, de Huadquina e Lobos de Tierra, no *Perú*, aproximam-se muito de *L. rufipes* a primeira e de *L. rufescens* a segunda. Devem ser reestudadas, com a descrição principalmente da fórmula das pernas e o reestudo do macho, quanto a 2.ª espécie.

f) *L. spadicea* SIMON(51) 1907, da *Bolivia* parece próxima de *L. rufipes*. Existe sómente um único exemplar, um macho. Nada se sabe sôbre o comprimento das pernas e dos artículos do palpo.

g) *L. flavescens* é um nomen nudum, atribuido ora a Nicolet ora a Simon e deve ser omitido dos catálogos. Nunca foi diagnosticada a aranha.

h) *L. laeta* (NICOLET) 1849(45), do Chile, Brasil e outros países sul e centro-americanos está exigindo um reestudo mais minucioso, o que será objeto de outro trabalho. O material, recebido do Chile e os especimens da coleção do Instituto Butantan, determinados como *laeta* por Mello-Leitão, autorizam-nos a concluir por ora, que a espécie chilena mais comum é a *L. rufipes*, devendo ser colocados em sinonimia os exemplares, até agora julgados como *laeta*. A espécie, descrita por Nicolet, deverá continuar com o nome original de *Scytodes laeta*.

i) *L. ornata* MELLO-Leitão(53) 1938 e 1941(54), de Cabana, na província de Cordoba, *Argentina*, é igual a *L. spadicea*, da Bolivia.

j) *L. variegata* SIMON(55) 1897, de San Pedro do *Paraguai*, importa em realidade apenas em um nomen nudum. Foi descrito apenas o colorido de um exemplar não adulto.

k) *L. surata* SIMON(51) 1907 é idêntica com *L. rufescens*, como pudemos ver em inúmeros exemplares reestudados.

l) *L. hirsuta* MELLO-Leitão(52) 1931, de Pedras Altas, no Município de Casimbinhas no Rio Grande do Sul, deve ser considerada como sinônima de *L. rufipes*.

m) *L. intermedia* MELLO-Leitão(48) 1934, de Petrópolis, no Estado do Rio de Janeiro, é idêntica também com *L. rufipes*.

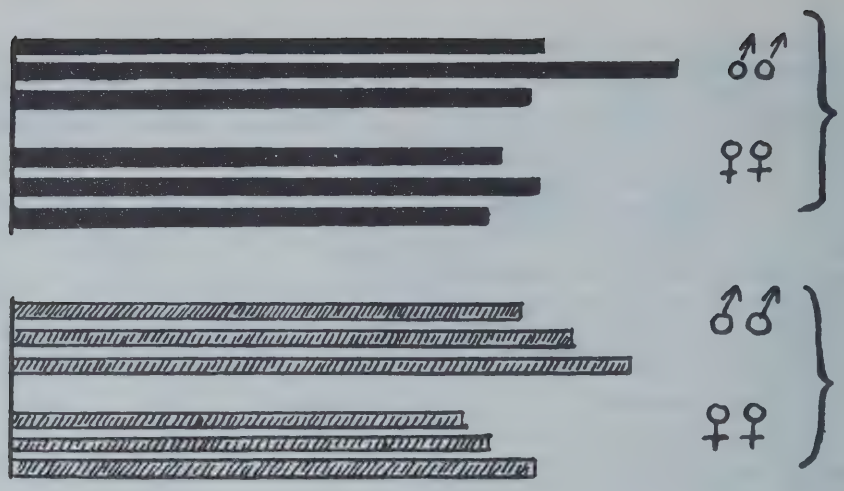


Fig. 3:

Comprimento da 1.ª, 2.ª e 4.ª perna, em 22 machos e 22 fêmeas:
"preto" = *L. rufescens*
"estriado" = *L. rufipes*

IV. BIOLOGIA DE L. RUFESCENS E L. RUFIPES:

1) *Habitat*:

Ambas as espécies são *lucífugas* e *sedentárias*. Vivem em buracos naturais de barrancos, sob cascas de árvores, nos vãos de troncos e pedras, em cavernas, sob *telhas* e *tijolos*, empilhados pelo homem. Êste último material constitui um refúgio ideal, escuro, arejado e com alimento (pequenos grilos, gafanhotos, baratas) fácil.

Os milhares de exemplares das 2 espécies, por nós capturados nos arredores de São Paulo, sempre foram recolhidos sob as pilhas de telhas ou tijolos, encostados nos quintais de casas rurais (fotografias 2 e 3). Em algumas capturas apreendemos lum exemplar sob cada tijolo e várias dezenas até 200 especimens sob 3 a 4 centenas de tijolos.

No frio do inverno não diminui a sua frequência. Também não procuram invadir ativamente as residências humanas. Pelo contrário, temos a impressão de que, quem as leva para a sua casa, é o próprio homem. Estabelecem-se então sob quadros e móveis, nos cantos escuros e menos devassados.

As duas espécies vivem sempre *separadas*, cada uma em seu "microambiente". Entretanto, numa e mesma *população* convivem os macho, as fêmeas e os filhotes de todas as idades.

Sua convivência não resulta, porém, em "comensalismo" ou em sociabilidade com vantagens mútuas. Pelo contrário, ainda que toda a população se mantenha sob a mesma pilha de tijolos, conserva cada aranha seu próprio domicílio, não se aventurando à invasão do ambiente alheio, afastado apenas cerca de 10 cm.

Constroem no vão da face inferior do tijolo uma *teia* de fios brancos, entrelaçados e reforçados, de 4 a 8 cm de diâmetro por 1 cm de altura. As camadas externas contêm substâncias adesivas, para facilitar a apreensão dos insetos que por aí passam. No meio da teia há uma área central, mais profunda e aí repousa a inquilina, agachada ao "substratum" (Fotografia 3). As aranhas não abandonam as teias mas esperam aí mesmo por seu alimento.

Quando se suspendem os tijolos, permanecem elas em seus esconderijos, podendo ser apreendidas fàcilmente. Quando estão fóra da teia, porém, são capazes de correr velozmente pelo chão. Não são capazes de subir por superfícies completamente lisas.

2) *Agressividade*:

As representantes das 2 espécies são realmente inofensivas, tímidas e fugidias. Quando molestadas, procuram invariavelmente fugir para locais escuros. Nunca vimos atitudes de agressão, nem sequer de defesa.

A vida *sedentária* em ambientes *escuros* e geralmente não devassados pelo homem e a sua *incapacidade* de tolerarem a lúz do dia fazem que estas aranhas possam viver em elevadas quantidades nas imediações do homem, sem molestá-lo comummente.

Sendo tomadas na mão, ném assim procuram morder. Para se conseguir que mordam pequenos animais de laboratório, é mister, comprimi-las contra o corpo dos mesmos.

Os poucos acidentes humanos, de que se tem notícia, confirmam sua índole mansa, pois ocorrem quási sempre sómente, quando elas se encontram na roupa de corpo ou de cama e quando são esmagadas contra o corpo humano.

A população rural não lhes costuma atribuir importância nenhuma, julgando-as totalmente inofensivas. De fato, uma vez temos "caçado" cerca de 300 exemplares de *L. rufipes* sob uma pilha de

Fotografia N.º 2: Tijolos empilhados ao ar livre constituem o habitat preferido por *Loxosceles rufipes* e *L. rufescens*.

telhas, encostadas no muro de um casebre do bairro do Morumbí, diretamente sob as janelas dos quartos de dormir. Ao lado pululavam as crianças descalças e no pequeno gramado havia a roupa, secando ao sol. Jamais houve um só acidente alí.

De uma outra vez nos foi dito por um homem, que nos acompanhava de perto, "que aquilo nunca seria uma aranha perigosa!"

Está fóra de dúvida, porém, que se verificam sempre alguns acidentes. Na pele humana a aranha consegue fazer apenas inoculações intradérmicas de sua peçonha.

3) *Biologia* :

Com um lote de *L. rufipes*, recebido em 1951 de Montevideo, e com vários exemplares de *L. rufipes* e *L. rufescens*, mantidos em cativeiro desde março de 1960 e ainda com o que temos observado em nossas excursões, pudemos anotar alguns dados biológicos, cujo resumo seria o seguinte:

A frequência entre *machos* e *fêmeas* em uma população é de cerca de 1 para 6 ou 7. A *média* da duração da vida é de um ano e 6 mêses. Com 11 a 13 mêses os indivíduos ficam adultos. Os machos procuram então as fêmeas: montam sôbre elas e lhes transmitem, atravéz de seus bulbos copuladores, o líquido espermático que é depositado nas 2 bolsas seminais das fêmeas. Durante o "*acasalamento*" mantém as fêmeas atitudes passivas. Logo depois retiram-se os machos. As fêmeas "fecundadas" constroem, então, a primeira *ooteca*. Tecem uma espécie de esteira redonda, com os bordos levantados e depositam no meio cerca de 12 a 15 *ovos*. Êstes são esverdeados, redondos, com cerca de 0,8 mm de diâmetro. Repuxam, então, os bordos laterais por cima dos mesmos e fecham a ooteca definitivamente. Tem ela a forma de um disco, comprimido dorso-ventralmente e um tanto transparente, podendo entrever-se os ovos. A ooteca tem cerca de 2 cm de largura por 0,4 cm de altura. Adere ao substratum e a mãe fica por perto, muitas vezes com os tarsos do primeiro par de pernas apoiados sôbre ela. A camada de fios externos é viscosa e qualquer inseto que fique preso nela, é morto e sugado pela mãe.

20 a 24 dias após a postura, irrompem os filhotes pelo corion dos ovos. Espalham-se, em seguida, na periferia interna da ooteca, com as cabeças viradas para fóra e mantêm esta posição curiosa por mais 8 dias, em média. Trocam, então, de pele e em seguida irrompem pelas paredes da ooteca e se ajuntam em torno da mãe. Os primeiros exercícios são executados na própria teia materna. Suas dimensões excedem mal 1,2 mm no tocante ao seu corpo e de 2,2 mm em suas pernas. 10 a 20 dias mais tarde absolvem nova *ecdise* e então principiam sua vida independente, espalhando-se pelos vãos das telhas ou de pequenos buracos.

Sem que tenha ocorrido novo acasalamento, constroi a mãe uma *segunda ooteca* e mais tarde

uma *terceira*, consumindo-se nesta tarefa 4 a 5 meses.

Não temos observado *canibalismo*. Encontrando-se duas fêmeas (em condições experimentais de laboratório), elas se desviam imediatamente, sem procurarem agredir-se. O encontro entre macho e fêmea, fóra da época do cio, resulta em rápida fuga da fêmea, embora físicamente o primeiro pareça mais fraco.

Durante os 11 a 13 mêses, que os filhotes levam até serem adultos, não se podem distinguir os machos das fêmeas. Sómente na penúltima muda de pele, antes da fase adulta, aparecem os *tarsos globosos* dos machos, a permitir uma distinção fácil dos 2 sexos. A *quota de mortalidade* dos filhotes deve ser elevada, chegando à fase adulta talvêz apenas 2 a 3 indivíduos de cada ninhada. De fato, em todas as populações pesquisadas na natureza, o número de filhotes não excedia geralmente o de fêmeas adultas.

V. AÇÃO DO VENENO:

Não temos conseguido até agora *veneno puro* em quantidades que pudessem ser pesadas com exatidão. O manejo de aranhas tão pequenas é difícil e as mesmas só picam e despejam o conteudo de suas glândulas venenífera, quando esmagadas.

O peso médio de uma glândula venenífera cheia, de uma *fêmea adulta*, retirada do corpo com todo o cuidado e dessecada na estufa, é de 0,5 *mg* e do *macho adulto* de 0,3 *mg*.

O *veneno* ou mais exatamente a *"substancia solúvel"*, obtida de extratos glandulares centrifugados, é de cerca de 0,14 mg para a fêmea adulta e 0,08 mg para o macho.

Em ensaios experimentais com coelhos e camundongos temos obtido, até agora, os seguintes resultados com as peçonhas das duas espécies:

Loxosceles rufescens:

1,5 glândulas = 0,21 mg de veneno: dose perfurante da orelha de coelho, em injeção intradérmica;

0,8 glândulas = 0,11 mg: dose 100% letal, subcutânea, para camundongos;

0,7 glândulas = 0,0098 mg: dose 100% letal, endovenosa, para camundongos;

0,5 glândulas = 0,07 mg: dose 50% letal, subcutânea, para camundongos.

0,1 glândulas = 0,014 mg: dose mínima necrosante, intradérmica, para a orelha do coelho ou camundongo.

Fotografia N.º 3: *Loxosceles rufipes*, repousando em sua teia.

Fotografia N.º 4: Início de necrose local num antebraço, causada pela injeção de 0,012 mg de veneno de *Loxoscelcs rufipes*.

Loxosceles rufipes:

2,0 glândulas = 0,28 mg de veneno: dose perfurante da orelha de coelho;

1,0 glândula = 0,14 mg de veneno: dose 100% letal, endovenosa, intramuscular ou subcutânea, para camundongos;

0,6 glândulas = 0,084 mg de veneno: dose 50% letal, intradérmica, para camundongos;

0,15 glândulas = 0,021 mg de veneno: dose mínima necrosante para a orelha de coelho ou camundongo.

Êstes resultados, evidentemente, são apenas aproximados. Outras experiências estão em andamento. A interpretação da dose *perfurante* e da *mínima necrosante* da orelha de coelho ou de camundongo não é de todo objetiva. Não se tem critério algum para transportar êstes dados para o câmpo humano, no intuito de obter-se qualquer conclusão sôbre os acidentes humanos fatais, que não podem ser negados. A fotografia n.º 4 apresenta uma lesão experimental num antebraço humano, obtida com a injeção intradérmica de 0,012 mg de veneno de *Loxosceles rufipes*.

O *comportamento* dos coelhos e camundongos, injetados com êstes venenos, é totalmente diferente do que se costuma observar, quando recebem venenos escorpiônicos ou da aranha ã*Phoneutria fera*. Assemelha-se um pouco com o quadro sintomático, causado pela peçonha de *Lycosa erythrognatha*, nenhum sintoma geral; coração, respiração, movimentos normais; nenhuma sudorese ou salivação; apenas profunda prostração, cada vêz mais progressiva e geral.

VI. SORO ANTI-LOXOSCELES:

Depois de terem os autores chilenos e uruguaios constatado a completa ineficiência dos sôros antiaracnídicos e tivessem vindo apêlos ao Instituto Butantan, desde 1951, para que se tentasse resolver o problema do *loxoscelismo* por meio de um sôro específico, impunha-se a feitura do mesmo.

Pelo estudo *sistemático* de especimens, recebidos do Uruguai e do Chile e do abundante material, obtido nos arredores de São Paulo e do interior do Estado, nos convencemos que êste sôro deveria ser feito com os antígenos das 2 espécies mais frequentes, a *Loxosceles rufescens* e a *L. rufipes*.

Milhares de glândulas venenígeras de ambas as espécies foram juntadas em glicerina. A Secção de Imunologia do Instituto Butantan preparava então as *soluções-mães* em soluto de salina-glicerina a 50%. 2 cavalos foram submetidos à imunisação progressiva por inoculações bi-semanais dos 2 an-

tígenos, conforme o seguinte esquema: 6-12-24-36-48-60-72-96-108 e 120 glândulas. O sôro obtido foi purificado e concentrado, de maneira que 5 ml neutralizassem pelo menos 50 doses mínimas necrosantes na orelha do coelho, de veneno de *L. rufipes* ou *L. rufescens*.

BIBLIOGRAFIA

1) Guzmán, C., Acidentes causados por insetos pozoñosos, Congreso Científico, Santiago, Chile, 1894; 2) Matus, M., Mancha gangrenosa - La Clinica, Chile 76:590, 1927; 3) Tirado, A., Aracnidismo cutáneo gangrenoso en Chile - Rev. Inst. Bacteriol. de Chile 1:4-5, 1931; 4) Escudero, E., Un caso de aracnoidismo mortal en Chile - Rev. Chil. Hist. Nat. 39:339, 1935; 5) Gallinato, A., Presentación de enfermos - Soc. Pediatr. de Chile, 1936; 6) Macchiavello, A., Arañas venenosas - El Mercurio de Antofagasta; março 1934; 7) Macchiavello, A., Nota preliminar sobre el aracnoidismo cutáneo gangrenoso de la Província de Antofagasta - Com. 1. Congr. Méd. Sanit., Santiago del Chile, 1934; 8) Macchiavello, A., Bol. Soc. Cirurg. de Chile, 1935; 9) Macchiavello, A., La *Loxosceles laeta* causa del aracnoidismo cutáneo o mancha gangrenosa de Chile - Rev. Chil. Hist. Nat. 41:11-19, 1937; 10) Macchiavello, A., Cutaneous arachnoidism or gangrenous spot of Chile - Puerto Rico Jorn. Publ. Health. Trop. Med. 22:425-467, 1947; 11) Macchiavello, A., Cutaneous arachnoidism experimentally produced with the glandular poison of *Loxosceles laeta* - ibidem 23:266-293, 1947; 12) Donoso-Barros, H., Consideraciones sobre el aracnoidismo cutáneo en Chile - Arch. med. Cir. y Esp. 33:184-206, 1948; 13) Bertin, V., Consideraciones sobre aracnoidismo en Chile - Rev. Chil. Hig. y Med. Prevent. 12:37-50, 1950; 14) Meneghello, J. e Emparanza, E., Loxoscelismo cutáneo-visceral y cortisona-Bol. Enferm. Parasit. Chil. 7:11-12, 1952; 15) Schenone, H. F., Mordeduras de arañas-ibidem: 8(2):35-37; 1953; 16) Pratts, Fl. e Schenone, H. F., Mordeduras de arañas. Nuevas consideraciones sobre el Loxoscelismo - Bol. Chil. Parasitol. 12(1):7-9; 1957; 17) Ribeiro-Rivera, R., Gangrena cutánea - Rev. urug. Dermat. Sifil. 1:238-239; 1936; 19) May, J., ibidem 1:239-240; 1936; 19) Volpe, A. e Barberousse, C. M., Un caso de muerte por picadura de araña - Arqu. Pediatr. Urug. 9:713-714; 1938; 20) Mackinnon, J. E., Arch. Urug. Med. Cir. y Esp. 13:575-580; 1938; 21) Costa, R. S. e Salveraglio, F. J., ibidem 14:417-430; 1939; 22) Costa, R. S., Brea, R., Garcia-Grosso, N. E. e Pontet, J. C., Arañeismo cutáneo-gangrenoso - Ass. Clin. Med. Urug. 2:267-286; 1939; 23) Stajano, C. - Arch. Urug. Med. Cir. y Esp. 27:446-449; 1945; 24) Mackinnon, J. E. - Ass. Inst. Hig. Montevideo 2:107-114; 1948; 25) Costa, R. S. e Salveraglio, F. J., Acidentes por picaduras de arañas, ibidem 3:51-66; 1944; 26) Costa, R. S., Arañeismo en nuestro país - ibidem:57-69; 1949; 27) Arroyo, L. e Witkind, J. - Acción pozoñosa de una araña domiciliaria del Uruguay sobre el ratón - Arqu. Biol. Montevideo 18:55-60; 1951; 28) Witkind, J., Nota sobre los aracnidos pozoñosos del Uruguay, particularmiente *Loxosceles laeta* - An. Fac. Med. Montevideo 38:531-558; 1953; 29) Mackinnon, J. E. e Witkind, J. - Aracnidismo necrótico-ibidem 38(3-4):76-100; 1953; 30) Delio Aguilar - Heridas pozoñosas por arañas - Anal. del Circulo Méd. Argentino 24:415; 1901 e Étude sémiologique des accidentes dus aux piquures d'arachnides - Rev. de la Soc. Méd. Arg. 16:69; 1908; 31) Sommer, B. e Greco, N. V. - Picaduras de arañas - Anal. de la Adm. San. y Assist. Publica: 446; 1910; 32) Del Pino, A., Picaduras de arañas pozoñosas - Tese, Buenos Aires; 1910; 33) Mazza, S., Formas nerviosas y cutáneas del aracnoidismo - tese - Buenos Aires, 1911; 34) Grecco, N. V. e Sommer, B. - Arañidismo - Anal. Depart. Nac. Hig. 21(3):123; 1914; 35) Houssay, B. A. - Las hemolisinas de las arañas - La Prensa Méd. Arg. 3:68; 1916; Arañas venenosas - Act. Pra. Conf. de Hig. Micr. y Pat.:545; 1916; Houssay, B. A. e Negrette, J. - Estudios experimentales sobre la acción de los venenos de las arañas - Soc. Biol. Barcelona 6:194; 1918 e Nuevos estudios experimentales sobre la acción fisiológica de las pozoñas de arañas - Rev. Inst. Bact. del Dep. Nac. Hig. 2:189; 1919; 36) Vellard, J., Le Venin des araignées - Monograf. Inst. Pasteur, Paris; 1936; 37) Ibarra-Grasso, A., Arañas y araneismo. Las arañas peligrosas en la República Argent. La Semana Medica, tomo cincoent. 2:763-793; 1944; 38) Atkins, J. A., Wingo, C. W. e Sodemann, W. A. - Probable cause of necrotic spider bite in the Midwest-Science 126:73; 1947; 39) Cchmauss, L. F. - Case of arachnoidism - J.A.M.A. 92:1265; 1929; 40) Gertsch, W. J. e Muleik, J. - Bull. Amer. Mus. Nat. Hist. 77:317; 1940; 41) Weiner, R. G., Stoffer, R. P., Chronock, F. W. e Young, R. B. - Massive intravascular hemolysis - Journ. Med. Soc. 61(4):20 - 206 - 207;1960; Bucherl, W., Aranhas do R;t wsánde do Sul - Mem. Inst. Butantab) 2( ):146-148; 0902; 43) Chamberlin, R., Brooklyn Mus. Sci. Bull. 3(2):39-40; 1920; 44) Gertsch, W. J. - The psider genus *Loxosceles* in North America, Central America and the West Indies - Am. Mus. Novit. 1907:1-47; 1958; 45) Nicolet - em Gay: Hist. Chili 10(3):349-350; 1849; 46) Moenckhaus, W. J. - Contribuição às aranhas de São Paulo - Rev. Mus. Paulista 3:77-112; 1898; 47) Mello-Leitao, C. - Scytodidas e Pholcidas do Brasil - Rev. Mus. Paulista 10:123-144; 1918; 48) Mello-Leitao - Espécies brasileiras do gênero *Loxosceles* Lowe - An. Acad. Bras. Ci. Rio de Janeiro 6:69-79; 1934; 49) Keyserling, E. - Verh. Zool. Bot. Ges. Wien 27:216; 1877; 50) Strand, E. - Mém. Soc. Neuchât. Sci. Nat. 5:819; 1914; 51) Simon, E. - Ann. Soc. Ent. Bélgique 51:247-248; 1907; 52) Mello-Leitao, C. - Bol. Biol. Rio de Janeiro 17:13; 1931; 53) Mello-Leitao, C. - Rev. Mus. La Plata (Zool). 1(4):91; 1938; 54) Mello-Leitao, C. - ibidem (Nova serie) 2:107-108; 1941; 55) Simon, E. Boll. Mus. Torino 12(270):5; 1897.

Reprinted from: ACAROLOGIA, 2: 1-34, 1960

NOTES D'ACAROLOGIE

XLV. ENQUÊTE ACAROLOGIQUE AU PÉROU

PAR

Flavio DA FONSECA.

(Instituto Butantan — São Paulo, Brésil).

Une petite collection d'acariens parasites obtenus au Pérou par le docteur J. M. DE LA BARRERA, qui nous fut communiquée par l'intermédiaire de l'Oficina Sanitaria Panamericana, nous permet d'augmenter sensiblement nos connaissances sur cet aspect de la faune péruvienne en doublant presque le nombre des espèces signalées dans ce pays.

Au petit nombre de mammifères examinés, à peu près 75, s'oppose celui relativement élevé de 15 espèces qui n'avaient pas encore été trouvées au Pérou. Cette disproportion démontre ou bien que la faune acarologique locale est encore très mal connue ou qu'elle est très riche et variée en raison de la multiplicité des zones écologiques dans un pays qui s'étend des forêts amazoniennes jusqu'aux sommets des Andes.

Voici la liste des espèces déjà trouvées au Pérou, aussi complète qu'il nous fut possible de la préparer.

1. *Atricholaelaps (Ischnolaelaps) chinchillulae* Strandtmann 1948.
   Hôte typ. : *Chinchillula sohamae.*
   Localité typ. : Caccacharra, Ilave, Pérou.
   STRANDTMANN, R. W. — *Proc. Ent. Soc. Wash.* 50 (7) : 187, 1948.

2. *Atricholaelaps (Ischnolaelaps) glasgowi* (Ewing 1925).
   Hôte typ. : rat sauvage.
   Localité typ. : Urbana, Illinois, U. S. A.
   Références : *Phyllotis arenarius, Punomys lemminus, Auliscomys boliviensis* et *Chaetomys pulcherrimus* ; Ilave, Pérou.
   STRANDTMANN, R. W. — *Proc. Ent. Soc. Was.* 50 (7) : 187, 1948.

3. *Eubrachylaelaps rotundus* Fonseca 1936.
   Hôte typ. : rat sauvage.
   Localité typ. : Butantan, São Paulo, Brasil.
   Référence : *Akodon mollis orophilus* ; Pérou.

Fonseca, F. da. — *Mém. Inst. Butantan X :* 17, 1935-1936.
Furman, D. P. — *Ann. of the Ent. Soc. of. Am.* 48 (1-2) : 51, 1955.

4. *Gigantolaelaps peruvianus* (Ewing, 1933).
Hôte typ. : rat sauvage.
Localité typ. : Lima, Pérou.
Référence : rat sauvage ; Pérou.
Ewing, H. E. — *Proc. Un. St. Nat. Mus.* 82 (30) ; 1. 1933.
Machiavello, A. — Oficina Sanitaria Panamericana.

5. *Bdellonyssus bacoti* (Hirst 1913).
Hôte typ. : *Rattus norvegicus norvegicus.*
Localité typ. : Assiut, Égypte.
Référence : rats sauvages ; Pérou.
Machiavello, A. — Of. Sanit. Panamericana.

6. *Ornithodoros amblus* Chamberlin 1920.
Localité typ. : Pérou.
Chamberlin, R. V. — *Brooklyn Mus. of Sc. Bull.* 3 : 35, 1920.

7. *Ornithodoros furcosus* Neumann 1908.
Localité typ. : Riobamba, Equador.
Neumann, R. G. — *Arch. Parasitol.* 12 : 1, 1908.
Réf. du Pérou. — Herrer, A. y Morales, J. — Observaciones en el *Ornithodoros forcosus* sobre su possible rol como vector de la fiebre recurrente. *Rev. de Med. Exper.* XI (1-2) : 34, 1957.

8. *Amblyomma maculatum* Koch 1844 (? *A. tigrinum* Koch, 1844).
Koch, C. L. — *Arch. f. Naturgesch,* X (1) : 18, 1844.
Référence : Pérou ; Neumann, C. — *Mém. Soc. Zool. de France,* XII : 249, 1899.

9. *Ixodes auritulus* Neumann 1904.
Hôte typ. : oiseau.
Localité typ. : Puenta Arenas, Détroit de Magellan, Chile.
Réf. du Pérou : Thrushi ; Oroya, Pérou. Lapit ; Lumin, Pérou.
Neumann, L. G. — *Arch. Parasitol.* 8 : 444, 1904.
Cooley, R. A. and Kohls, G. M. — *Nation. Inst. of Health Bull.* N° 184 : 195, 1945.

10. *Crotiscus aetherios* Brennan 1957.
Hôte typ. : *Chinchillula sohamae.*
Localité typ. : Limbani, Puno, Pérou.
Référence : *Neotomys ebriosus* ; Limbani, Puno, Pérou.
Brennan, J. M. — *The Journ. of Parasit.* 43 (6) : 673, 1957.

11. *Crotiscus dispar* Brennan 1957.
Hôte typ. : *Punomys lemminus.*
Localité typ. : Limbani, Puno, Pérou.
Brennan, J. M. — *The Journ. of Parasit.* 43 (6) : 673, 1957.

12. *Crotiscus frigipes* Brennan 1957.
Hôte typ. : *Neotomys ebriosus.*
Localité typ. : Limbani, Puno, Pérou.

Référence : *Chinchillula sohamae* ; Limbani, Puno, Pérou.

BRENNAN, J. M. — The *Journ. of Parasit.* 43 (6) : 673, 1957.

13. *Crotiscus hayesi* Brennan 1957.

Hôte typ. : *Lagidium peruanum.*
Localité typ. : Limbani, Puno, Pérou.

BRENNAN, J. M. — *The Journ. of Parasit.* 43 (6) 673, 1957.

14. *Crotiscus thomasi* (Oudemans 1910).

syn. : *Microthrombidium thomasi* Oudemans 1910 ; *Otonyssus thomasi* (Oudemans 1910) ; *Trombicula (Croticella) thomasi* (Oudemans 1910) ; *Trombicula (Eutromcula) thomasi* (Oudemans 1910).

Hôte typ. : *Akodon jelskii.*
Localité typ. : Pérou.

OUDEMANS, A. C. — *Entom. Berichten* 3 (54) : 83, 1910.
BRENNAN, J. M. — *The Journ. of Parasit.* 43 (6) : 673, 1957.

15. *Euschoengastia phyllôti* Wharton 1948.

Hôte typ. : *Phyllotis darwini.*
Localité typ. : Caccachara, Ilave, Pérou.
Référence : *Chinchillula sohamae* ; Caccachara, Ilave, Pérou.

WHARTON, G. W. — *Psyche* 55 (2) : 87, 1948.

16. *Eutrombicula alfreddugesi tropica* (Ewing 1925).

Hôte typ. : *Anadia taeniata.*
Localité typ. : Chama River, Venezuela.

EWING, H. E. — *Am. Journ. Trop. Med.* 5 : 258, 1925.

17. *Kaaia peruensis* Brennan 1958.

Hôte typ. : *Punomys lemminus.*
Localité typ. : Limbani, Puno, Pérou.
Référence : *Neotomys ebriosus* ; Limbani, Puno, Pérou. *Phyllotis osilae* ; Heda, Pairumani, Puno, Pérou.

BRENNAN, J. M. — *Journ. of the Kansas Ent. Soc.* 31 (2) : 71, 1958.

18. *Odontacarus australis* (Ewing 1929).

syn. : *Trombicula australis* Ewing 1929.
Hôte typ. : *Tropidurus peruvianus.*
Localité typ. : Verrugas Canon, Lima, Pérou.

EWING, H. E. — *Proc. Ent. Soc. Was.* 31 (1) : 9, 1929.

19. *Tragardhula peruviana* (Ewing, 1926).

syn. : *Trombicula peruviana* Ewing, 1926.
Trombicula (Megatrombicula) peruviana (Ewing 1926).
Localité typ. : El Campamento, Pérou (Adulte).

EWING, H. E. — *Ent. News* 37 : 112, 1926.

20. *Trombicula biops* Wharton 1948.

Hôte typ. : *Phyllotis darwini.*
Localité typ. : Ilave, Pérou.
Référence : *Phyllotis boliviensis* ; Caccachara, Ilave, Pérou.

WHARTON, G. W. — *Psyche* 55 (2) : 87, 1948.

21. *Trombicula chara* Wharton 1948.
Hôte typ. : *Phyllotis darwini.*
Localité typ. : Ilave, Pérou.
Référence : *Phyllotis boliviensis* ; Caccachara, Ilave, Pérou.
Wharton, G. W. — *Psyche* 55 (2) 87, 1948.

22. *Trombicula japa* (Ribeyro et Bambarén 1922).
syn. : *Leptus japa* Ribeyro et Bambarén 1922.
Hôte typ. : ?
Localité typ. : Pérou.
Ribeyro, R. E. y Bambarén, C. A. — *Arch. Ass. Peruana para el Progr. Cien.* 2 : 115, 1922.

23. *Trombicula paersoni* Wharton 1948.
Hôte typ. : *Punomys lemminus.*
Localité typ. : Caccachara, Ilave, Pérou.
Wharton, G. W. — *Psyche* 55 (2) : 87, 1948.

24. *Trombicula shannoni* Ewing 1929.
Hôte typ. : *Felis catus.*
Localité typ. : Verrugas Cañon, Lima, Pérou.
Ewing, H. E. — *Proc. Ent. Soc. Was.* 31 : 10, 1929.

Ce sont donc vingt quatre espèces dont la majorité rencontrée une seule fois dans le pays. Dans la présente étude nous avons pu confirmer la présence d'*Atricholaelaps (Ischnolaelaps) glasgowi*, *Eubrachylaelaps rotundus* et *Gigantolaelaps peruvianus* ; toutes les autres espèces signalées dans ce travail représentent des constatations nouvelles pour le Pérou.

Macchiavello a récemment fait allusion à la rencontre dans ce pays de *Gigantolaelaps peruvianus*, de *Gigantolaelaps* n. sp., d'un *Laelaps* ressemblant à *L. thori* Fonseca 1938 et de *Bdellonyssus bacoti* (Hirst 1913). Sans vouloir nier la présence du *B. bacoti* au Pérou, nous croyons néanmoins prudent de rappeler l'existence dans ce pays de *B. lutzi* (Fonseca 1941) qui y est fréquent et pourrait être confondu avec l'espèce de Hirst, d'autant plus qu'il a été aussi trouvé sur des rats cosmopolites.

IXODIDES

Argasidae.

Argas reflexus (Fabricius 1794).

L'espèce par laquelle nous commencerons existait déjà dans notre laboratoire depuis 1952 avec l'indication de provenance d'Arequipa, au Pérou, et nous profiterons de l'occasion pour la citer à côté du matériel recueilli par de la Barrera.

Les grandes dimensions de cette espèce la distinguent immédiatement de sa

congénère fréquente au Brésil, *A. miniatus* Koch ; l'auteur n'a jamais vu de spécimens de la grande taille citée par NUTTALL pour le *A. persicus* Oken. A notre connaissance c'est l'unique espèce d'*Argas* du Pérou, où il est d'ailleurs possible qu'il existe une des deux espèces citées plus haut parasites communs des volailles.

Après l'avoir étudiée nous sommes arrivé à la conclusion qu'il s'agissait d'une espèce très voisine de l'*Argas magnus*, de la république voisine, l'Équateur, décrite en 1896 par NEUMANN qui la considéra plus tard comme une sous-espèce de l'*Argas reflexus*, très fréquent dans les pigeonniers d'Europe. COOLEY et KOHLS dans leur Monographie de 1944 ont considéré l'*Argas magnus* comme synonyme d'*Argas reflexus*. Le matériel d'Arequipa n'a point d'indications sur les particularités de la capture. Dans le lot, qui a reçu dans notre collection le N° 5638 se trouvent des nymphes, des mâles et des femelles, les plus grandes de ces dernières atteignant 11.0 mm.

Ornithodoros.

Dans le matériel capturé par le Dr. J. M. DE LA BARRERA et envoyé par l'Oficina Sanitaria Panamericana pour être déterminé figuraient deux espèces d'*Ornithodoros* dont l'une représentée seulement par des nymphes et l'autre par les nymphes, mâles et femelles, leur principal caractère distinctif consistant dans la présence ou l'absence de « joues » et dans l'aspect des mamelons. Les deux seules espèces de ce genre rencontrées jusqu'ici au Pérou étaient l'*Ornithodoros amblus* Chamberlin 1920 et l'*Ornithodoros furcosus* Neumann 1908. Le premier, parasite les oiseaux des îles de guano où il est rencontré en abondance ; il n'a pas encore été trouvé sur des mammifères. La taille plus grande et les mamelons plus développés le distinguent des espèces ici décrites. L'*Ornithodoros furcosus* en diffère par les tubérosités du tarse I et par sa taille plus grande ; son existence au Pérou fut enregistrée par HERRER et MORALES en 1957, qui ne purent discerner aucune trace d'infection chez ces Argasidés par des *Borrelia* du pays, qui semblent plutôt être transmises par des poux. Nous tâcherons de décrire les deux nouvelles espèces en commençant par celle qui présente aussi des adultes.

Ornithodoros aragaoi sp. n.

De cette espèce on a pu obtenir une femelle et trois mâles, outre les nymphes.

Femelle. — Idiosoma long de 4.3 mm et large de 2.9 mm, les côtés parallèles, l'extrémité antérieure plus étroite et la postérieure arrondie. Gnathosoma et capuchon invisibles à l'examen par la face dorsale. Les toutes petites granulations, ont des dimensions à peu près égales, même aux bords et à l'opisthosoma, présentant le centre élevé et les bords étoilés avec trois ou quatre rayons. Les disques sont peu différenciés et d'observation difficile, petits et en petit nombre. Le capuchon est petit, étroit, et se continue avec la paroi du propodosoma. Sillon dorso-ventral

absent ; sillon post-anal présent et pre- et post-anaux transverses profonds dans la région centrale. Plis coxaux et supra-coxaux présents, le dernier n'atteignant pas le péritrème. Yeux absents et péritrèmes très saillants. Orifice sexuel large. Les joues sont petites et présentent la surface externe mamelonnée. Gnathosome mesurant 0.4 mm avec une paire de soies post-hypostomiques. Hypostome très court, sans dépression apicale avec des dents peu développées, semblant disposées en trois séries. Pattes courtes, leur tégument ponctué. Coxa de la patte I un peu séparée de la suivante. Tarse I présentant une petite saillie sous-apicale absente aux autres extrémités tarsales, sans autres élévations.

Mâle. — Ne semble différent de la femelle que par ses dimensions un peu plus petites, mesurant 4.0 mm × 2.2 mm, et par la forme de l'orifice génital qui est à peu près aussi long que large.

Nymphe. — Les nymphes pourvues de joues, trouvées dans le même nid de rongeur que les adultes et les nymphes sans joues, diffèrent beaucoup des adultes par l'aspect des granulations, les différences étant si prononcées que l'existence d'une troisième espèce n'a pu être exclue. Chez ces nymphes les granulations sont plus grandes, plus élevées, plus nombreuses, la taille augmentant à mesure qu'elles sont plus postérieures, leur forme étant plus allongée aux bords qu'au centre de l'idiosoma. On aperçoit nettement plus de dix disques de chaque côté. Les joues sont bien plus petites que chez les adultes et difficiles à examiner. La taille des cinq nymphes varie de 2.3 à 2.9 mm. Par leur aspect elles rappellent le *O. rudis* mais en diffèrent par plusieurs caractères cités par Cooley et Kohls dans leur description des espèces nord-américaines. Nous jugeons plus prudent de ne pas identifier provisoirement ces nymphes à l'*Ornithodoros aragaoi* sp. n.

L'existence de joues dans la nouvelle espèce permet de la distinguer de *cooleyi*, *coriaceus*, *davisi* sp. n., *eremicus*, *hermsi*, *nicollei*, *parkeri*, *rostratus* et *turicata* ; l'absence d'une entaille apicale dans l'hypostome de *O. aragaoi* le différencie de *concanensis*, *dunni*, *dyeri*, *kelleyi*, *stageri* et *yumatensis* ; les dents très nettes chez *brodyi* et la forme effilée de son extrémité antérieure établissent une distinction avec l'espèce péruvienne ; *azteci* a aussi l'extrémité du propodosoma amincie et très différente ; l'uniformité des granulations chez la nouvelle espèce l'écarte de *viguerasi* ; l'absence d'un sillon dorso-ventral et la moindre taille des granulations, qui ne sont pas plus grandes près des bords, distinguent la nouvelle espèce des caractères opposés de *rudis* et de *brasiliensis* ; chez *amblus* et *talaje* les disques sont très nets au contraire d'*aragaoi* ; *furcosus* et *brasiliensis* présentent des élévations dorsales larges et modérées dans le tarse I qui n'existent point chez l'espèce ici étudiée.

Description basée sur l'holotype femelle et l'allotype mâle N° 3.824. Un paratype mâle et quatre nymphes N° 35.859. Tous recueillis le 26-XI-1955 dans un nid du rat *Oryzomys xanthacolus* à Llampa, Ancash, Pérou, en même temps que trois nymphes de *O. davisi* sp. n.. L'espèce est dédiée à mon maître, mon ami et mon collaborateur le Prof. Henrique Beaurepaire Rohan Aragao, récemment décédé, qui pendant un demi siècle a étudié la faune ixodologique néotropicale.

Ornithodoros davisi sp. n.

Seulement les nymphes de cette espèce sont connues, rencontrées en même temps que *O. aragaoi* sp. n.. Les différences avec la phase adulte étant insignifiantes chez les espèces bien étudiées, la description d'une nouvelle espèce basée sur l'étude de la phase nymphale ne peut pas être accusée de perturber la systématique des Argasidés. L'absence de joues, les mamillons qui sont encore plus petits, aplatis et uniformes et l'existence de deux poils seulement dans la « coquille » (« Wanne » de Schulze) de l'organe de Haller, au lieu de six comme chez *O. aragaoi* la distinguent de cette espèce.

Les deux nymphes mesurent respectivement 3.3 et 2.7 mm. Leur idiosoma est elliptique à extrémité antérieure effilée et postérieure arrondie. Les granulations sont très petites, très nombreuses, leur taille étant d'une uniformité marquante. Des petits disques, les plus grands centraux, très nets, sont au nombre d'à peu près dix de chaque côté.

On voit de nombreux poils très courts. Yeux absents. Plis coxaux et supra-coxaux présents, aussi bien que les sillons pre- et postanaux longitudinaux ; pas de sillon dorso-ventral. Il n'existe pas de joues. L'hypostome a deux séries de cinq à six dents plus longues que chez *O. aragaoi* sp. n.

Coxa I un peu séparée de la suivante ; toutes les autres sont contiguës. Tarse I sans autres élévations en dehors de la protubérance sous-apicale qui est petite et absente au tarse IV.

Comparé aux femelles des autres espèces américaines l'*Ornithodoros davisi* sp. n. peut être distingué par les caractères suivants : par l'absence de joues il diffère de *amblus*, *aragaoi* sp. n., *azteci*, *brasiliensis*, *brodyi*, *cancanensis*, *dunni*, *dyeri*, *kelleyi*, *nattereri*, *rudis*, *stageri*, *talaje*, *viguerasi* et *yumatensis* ; par le complet effacement du sillon dorso-ventral il se distingue de *coriaceus*, *eremicus*, *hermsi*, *nicollei*, *parkeri* et *rostratus* ; par les tarses lisses sans élévations il est facilement séparé de *cooleyi*, *furcosus* et *nattereri*.

L'aspect des granulations chez les nymphes de *O. davisi* sp. n. rappelle de si près l'aspect des adultes de l'*Ornithodoros aragaoi* sp. n. que nous aurions certainement classé ces jeunes dans l'espèce *aragaoi* ne fut-ce l'absence des joues ; le nombre différent de poils dans la « coquille » (« Wanne » de Schulze) de l'organe de Haller contribue aussi à établir la distinction entre les deux espèces.

Description basée sur l'examen de trois nymphes, N° 3860, recueillies le 26-11-55 en même temps que l'*O. aragaoi* dans un nid d'*Oryzomys xanthocolus* à Llampa, Ancash, République du Pérou. Un autre lot de même provenance, N° 3766, sur le même hôte, capturé le 28-11-56. Mâle, femelle et larves inconnus. L'espèce est dédiée à G. E. Davis du Rocky Mountain Laboratory, de Hamilton, Montana, pour son importante contribution à la biologie des *Ornithodoros*.

Étude comparée de l'organe de Haller chez *O. aragaoi* et *O. davisi*.

Utilisant les observations si minutieuses de SCHULZE dans son essai monographique — Geruchsorgane der Zecken — nous avons tenté d'observer l'aspect de cet organe chez les deux *Ornithodoros* capturés au même temps. Chez la femelle d'*aragaoi* la capsule de l'organe de Haller est bien développée, un peu plus longue que large, présentant dix poils sensoriels dont sept semblent naître à la paroi postérieure. La « coquille » (« Wanne » de Schulze) n'est pas approfondie, possédant deux ou trois poils plus forts et deux autres plus courts. Le groupe postérieur est composé de quatre poils, dont un plus long et le faisceau antérieur est constitué par deux poils seulement, dont un plus long. Chez le mâle la capsule a son diamètre longitudinal supérieur au transversal et présente cinq poils ou plus dans la paroi antérieure, la postérieure n'étant pas visible à cause de l'excès de sécrétion. Dans la « coquille » seulement trois poils dont deux plus longs et à pointe mousse. Le faisceau postérieur a quatre poils, dont deux longs et l'antérieur possède deux poils dont l'un est plus long. Chez la nymphe d'*aragaoi* l'aspect est identique à celui de la femelle, la capsule présentant cinq poils d'implantation à la paroi postérieure, quatre ou cinq autres étant fixés à la paroi antérieure, l'excès de sécrétion empêchant un examen plus approfondi.

La coquille plutôt élevée, a six poils, dont quatre plus longs. Le faisceau antérieur a deux poils, dont un très long, et le faisceau postérieur a quatre poils, dont un est long.

Chez la nymphe de *O. davisi* la capsule est aussi légèrement allongée et présente cinq poils à la paroi postérieure dont trois sont longs et deux très courts, deux autres poils courts prenant origine dans la région la plus profonde. Sept poils très courts semblent implantés à la paroi antérieure. Une couronne de poils courts et deux autres plus forts sont bien visibles dans la capsule. La « coquille » est élevée, située tout près de la capsule, et semble garnie de deux poils seulement, contrairement à *aragaoi* qui en présente six. Le faisceau postérieur a trois poils plus rapprochés de la capsule et le faisceau antérieur possède deux longs poils.

IXODIDAE.

Boophilus microplus (Canestrini 1887).

Cette espèce de tique très commune sur le bétail en Amérique du Sud était représentée une seule fois dans la présente collection, récoltée sur un *Cervidae, Mazama* sp., à Catacaos, Piura.

Hemaphysalis leporispalustris Pakard.

C'est la tique qui entre dans la constitution des biocènes formés d'autre part par le lapin sauvage et la *Rickettsia rickettsi*, ou par ce rongeur et la *Pasteurella tularense*, qui y circulent d'une façon indéfinie, en contribuant à l'entretien de la Fièvre Pourprée et de la Tularémie dans la nature en l'absence de l'homme. Elle

atteint, au sud, l'Argentine et fut rencontrée une seule fois au Pérou sur un *Sylvilagus brasiliensis* de Tierra Amarilla.

Ixodes affinis Neumann 1899.

Le petit nombre d'espèces appartenant au genre *Ixodes* Latreille jusqu'ici rencontrées en Amérique du Sud s'oppose au nombre élevé d'espèces de l'Amérique du Nord et de l'Amérique Centrale, d'où Cooley et Kohls ont catalogué 41 espèces dans leur Monographie de 1945, quelques-unes atteignant, dans leur dispersion, le continent Sud-américain. A notre connaissance l'unique espèce signalée au Pérou est l'*Ixodes auritulus* Neumann 1904. L'*Ixodes* qui nous fut envoyé par l'Oficina Sanitaria Panamericana provenant du Pérou est voisin de l'*Ixodes aragaoi* Fonseca 1935, du Brésil, mais en diffère par plusieurs caractères. Dans l'espèce péruvienne la femelle a des ponctuations marginales plus grandes à l'écusson dorsal, dont la forme et la couleur sont différentes, les palpes sont plus courts ; chez les mâles l'existence d'une épine interne à la coxa II, l'entaille au sommet de l'hypostome, dont les dents postérieures sont plus médianes, et le fait de ne pas rencontrer mâles et femelles accouplés comme chez *aragaoi* sont des caractères différenciels.

Dans la clef de Cooley et Kohls l'espèce du Pérou coïncide avec l'*Ixodes angustus* Neumann, en différant par les carènes latérales plus nettes dans la femelle d'*angustus*, chez laquelle l'épine interne de la coxa I est bien plus petite ; le mâle d'*angustus* peut être facilement distingué par les dents de l'hypostome plus petites et par l'absence d'une forte ponctuation dans la plaque médiane.

L'espèce avec laquelle le matériel étudié coïncide parfaitement est l'*Ixodes affinis* Neumann 1899, espèce en synonymie de laquelle Cooley et Kohls avaient placé *Ixodes aragaoi* Fonseca 1935, ce qui ne fut pas accepté par Aragao et Fonseca qui sont parvenus à démontrer leur diversité spécifique, basée non seulement sur l'existence chez *affinis* d'à peu près vingt ponctuations très grandes au bord de l'écusson de la femelle, mais aussi sur d'autres différences citées plus haut dans ce travail.

Le lot qui nous fut envoyé comprenait trois femelles à divers degrés de réplétion, trois mâles, deux nymphes et trois larves. Le péritrème de la femelle, qui présente une ou deux séries de ponctuations au côté où elles sont plus abondantes et la forme de l'écusson dans le même sexe, lequel n'est pas aussi arrondi que dans les exemplaires nord-américains furent les divergences avec la description présentée par Cooley et Kohls. La dernière différence conduit à l'altération du paragraphe 36 de la clef pour les femelles des auteurs nord-américains de façon à distinguer l'espèce de l'*Ixodes angustus*, ce qui est facile en raison de la moindre taille de l'épine interne de la coxa I et de l'absence de grandes ponctuations au bord postérieur de l'écusson dorsal chez cette dernière espèce.

La femelle d'*affinis* est moins allongée que celle d'*aragaoi*, la base du gnathosoma et les palpes sont plus courts, ses poils sont plus longs et plus denses, les bras du sillon génital sont plus rapprochés. Chez les mâles la couleur est plus claire

dans *affinis*, au contraire d'*aragaoi* qui a les parties chitinisées noires ; les auricules plus apparentes et les mâles toujours accouplés chez *aragaoi* sont aussi des caractères différenciels. Les nymphes d'*affinis* ont à peu près six grandes ponctuations au bord de l'écusson dorsal ; la coxa I a deux épines dont l'interne plus longue atteignant la coxa II. L'hypostome de la nymphe, examiné à la loupe, a la formule 2/2 ; monté sur baume on y voit une troisième série interne de très petites dents. Une femelle à jeun mesurait 2.7 mm, dont 2.0 mm pour l'idiosoma, et l'écusson dorsal occupait 1.1 mm. Longueur des mâles variant de 1.9 à 2.1 mm, dont 1.6 à 1.8 mm pour l'idiosoma.

Le lot décrit a recu le N° 3973 et fut capturé sur *Oryzomys xanthocolus* à El Sauce, Département de Piura, le 20-5-56. Autres lots N° 3974 avec une femelle et deux nymphes capturées sur un *Sigmodon peruanus* à El Sauce ; N° 3975 avec une nymphe et une larve obtenues sur *Oryzomys xanthocolus* de même provenance ; N° 3977 avec une nymphe rencontrée sur un *Sylvilagus brasiliensis* à Tierra Amarilla, à côté de l'*Hemaphysalis leporispalustris*.

Ixodes luciae Senevet 1935.

Il s'agit d'un autre *Ixodes* jusqu'ici non signalé au Pérou et qui y est maintenant capturé en plus grand nombre qu'il n'a jamais été indiqué dans toutes les références antérieures. Connu presque uniquement sur certains *Didelphys*, dont la tique la plus commune est l'*Ixodes loricatus* Neumann, il est maintenant possible avec le matériel du Pérou de confirmer ce qui avait été observé avec du matériel de Bolivie, où il fut capturé une fois sur *Cuniculus paca*, c'est-à-dire qu'il ne s'agit point d'un parasite exclusif des *Didelphys*. Le matériel du lot N° 3822, de Cacataos, à Piura, comprenant deux femelles, fut capturé sur un cerf, *Mazama* sp.

Tous les autres lots d'origine péruvienne, N^{os} 3828 à 3839, donc au nombre de douze, furent capturés à la phase adulte sur l'*Oryzomys xanthocolus*. Tout ce matériel provient de Papayal, Platanal et principalement de Cascas, Département de Tumbes.

La copulation ne fut observée que sur l'un des 4 lots où il y avait des mâles. Des nymphes furent rencontrées trois fois et des larves une seule fois.

Les seuls spécimens de notre collection qui proviennent du Brésil sont ceux du lot N° 3845 et nous furent communiqués par feu le Prof. H. Aragao, qui les avait obtenus par l'intermédiaire du Dr. H. Laemmert dans une forêt à Lazaropolis do Prata, Municipalité de Igarapé-Açú, État de Para, alors qu'ils parasitaient une « Quica », *Metachirops opossum*.

Nous avons pu jusqu'ici déterminer des exemplaires de Bolivie, du Brésil et du Pérou ; Senevet lui attribue comme patrie la Guyane Française ; Cooley et Kohls font allusion à la constatation faite par Aragao en Argentine sur *Didelphys paraguayensis* et y ajoutent ses observations des Honduras Britanniques sur *Didelphys mesamericana tabascensis*, de Guatemala sur *D. mesamericana*, *D. m. mesamericana* et en liberté, et du Panama sur *D. m. etensis*.

D'après Cooley et Kohls cette tique serait l'*Ixodes loricatus spinosus* Nuttall 1910, dont le nom est préoccupé par *Ixodes spinosus* Neumann 1899, lui aussi en synonymie, cette fois d'*Ixodes fuscipes* Koch 1844.

MESOSTIGMATA

Laelaptidae.

Gigantolaelaps inca sp. n. (Fig. 1 et 2).

Les espèces appartenant au genre *Gigantolaelaps* Fonseca sont toutes très voisines, par leur morphologie, les différences spécifiques étant plus une question de degré d'accentuation de certains caractères. Le *G. oudemansi* Fonseca 1939 est

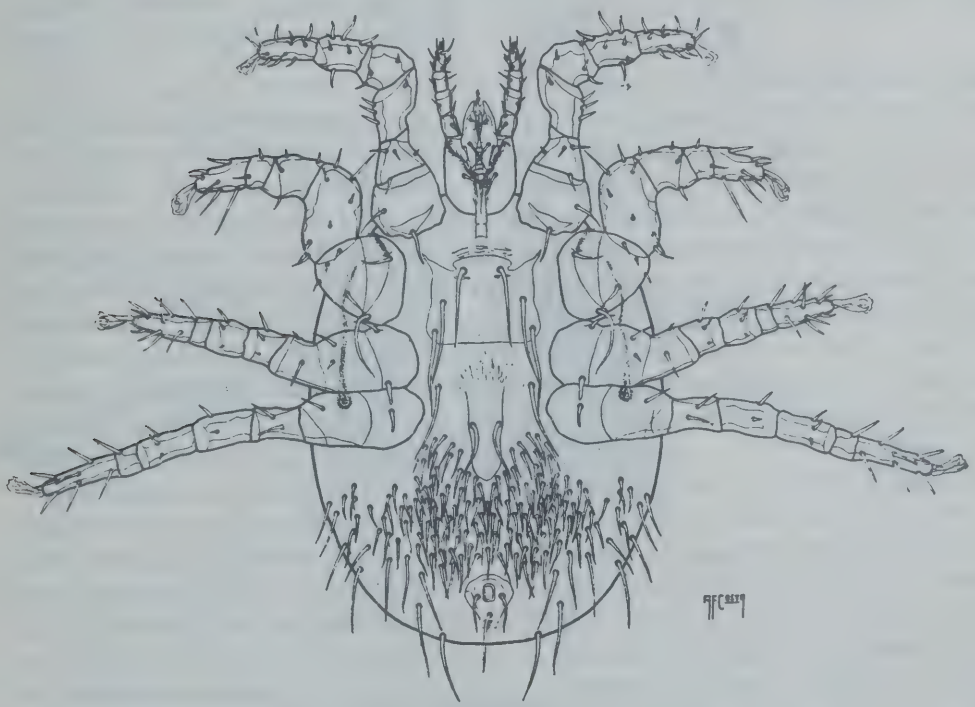


Fig. 1. — *Gigantolaelaps inca* sp. n.

une exception à cette règle, en possédant des poils supplémentaires à la plaque sternale ; particularité qui sera peut-être plus tard utilisée pour l'établissement d'un genre ou sous-genre. L'espèce qui va être décrite est aussi un représentant aberrant du genre, puisqu'il présente l'écusson dorsal densément couvert de poils relativement courts, en rappelant l'espèce *G. oudemansi* par ses petites dimen-

sions, par sa plaque génitale non dilatée et par l'écusson dorsal étroit et à extrémité droite. L'absence de l'hypertrichose sternale, la soie plus longue à la coxa II, l'écusson dorsal à extrémité encore plus tronquée, en y présentant quatre poils et à surface densément poilue distinguent facilement les deux espèces.

Femelle.

L'espèce n'est connue que par les femelles du lot type, qui est composé de six échantillons à pattes élargies, excepté celles de la quatrième paire, et à poils longs aux bords.

Idiosoma. — Long d'à peu près 1.380 μ et large d'environ 1.100 μ donc un peu plus petit et plus large que le *G. oudemansi*, l'extrémité antérieure un peu pointue et la postérieure légèrement concave.

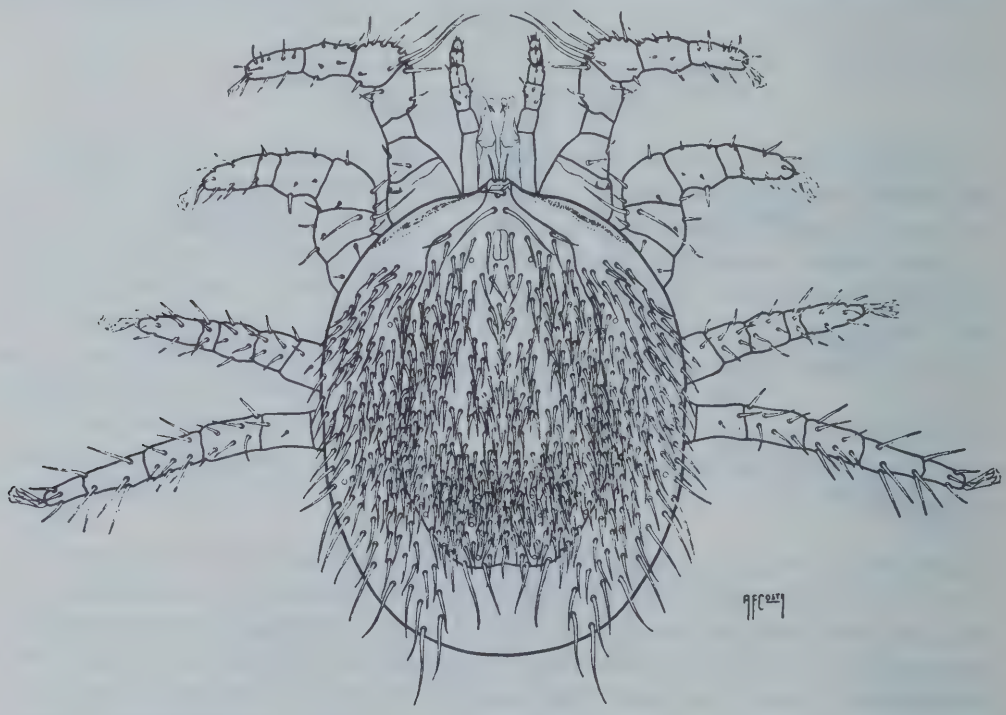


FIG. 2. — *Gigantolaelaps inca* sp. n.

Face ventrale. — La plaque sternale présente la projection si caractéristique pour ce genre en recouvrant légèrement la base du tritosternum, ses bords antérieurs et latéraux différenciés, l'antérieur moins et le postérieur légèrement concaves. Seuls les angles antérieurs sont prolongés, les postérieurs étant arrondis. Les poils sont robustes et longs, implantés sur une tubérosité peu saillante, les antérieurs marginaux. Poils antérieurs longs de 222 μ, moyens 250 μ et postérieurs 260 μ

La plaque est longue de 252 μ en son milieu, large de 295 μ au niveau de la deuxième paire de poils, et de 362 μ au niveau des angles postérieurs. La plaque génitale se rétrécit dès sa base, où elle mesure à peu près 126 μ étant large de 110 μ au niveau de l'unique paire de soies, lesquelles sont implantées à 183 μ du sommet qui est à 350 μ de la base de la plaque anale. Le *G. peruvianus*, dont la plaque génitale a une largeur maximum de 350 μ, permet d'évaluer l'étroitesse de la même plaque chez la nouvelle espèce. Anale 115 μ de long, 150 μ de large avec les angles différenciés, parcourue par plusieurs lignes. L'orifice anal est très grand, mesurant 60 μ, son extrémité antérieure est à une distance de 25 μ du bord antérieur de la plaque. Le poil postérieur, le plus fort, est long de 172 μ ; ceux de la paire antérieure sont implantés immédiatement en arrière d'une ligne passant au milieu de l'anus et mesurent 90 μ. Plaques inguinales (métapodales) et métasternales peu développées. La surface ventrale découverte a plus de cent poils dont la taille augmente à mesure qu'ils sont plus postérieurs, les plus petits longs de 85 μ et les plus grands, localisés au bord postérieur, longs de 210 μ. Stigmates dans la position habituelle et *peritrematalia* très chitinisés, non prolongés en arrière.

Face dorsale. — Écusson dorsal 1190 μ de long, n'atteignant donc pas l'extrémité postérieur de l'idiosoma en laissant découverte une bande progressivement plus large en arrière. Son extrémité antérieure est effilée et les bords latéraux sont parallèles à peu près entre les niveaux des hanches I et IV ; sa plus grande largeur atteint 700 μ. Il devient de plus en plus étroit en arrière où il se termine en un bord postérieur tronqué, très légèrement concave, séparé des bords latéraux par les poils qui suivent immédiatement les poils marginaux postérieurs ; à ce niveau le bord postérieur est large de 255 μ, la distance qui sépare les poils postérieurs étant de 135 μ. Les poils postérieurs longs de 170 μ et ceux de la paire suivante de 200 μ, donc plus grands, ce qui représente une exception dans ce genre. La surface de l'écusson est réticulée et présente plusieurs formations rondes et claires dont quatre sont antérieures aux deux paires de poils que nous venons de citer.

Des poils verticaux (F1-F3 de ZACHVATKIN) les deux paires antérieures sont constituées de poils rigides, les plus antérieurs dirigés en avant et les moyens en haut, ceux de la troisième paire étant de beaucoup les plus longs et flexibles et les plus longues soies de l'écusson, mesurant 210 μ contre seulement 185 μ de longueur de la première paire submédiane (D1 de ZACHVATKIN). La taille des poils décroît en arrière jusqu'à atteindre seulement 70 μ. Le nombre de soies de l'écusson dorsal est extraordinairement élevé, atteignant plusieurs centaines, rappelant l'aspect d'un *Haemogamasidae* ou de certains *Eulaelaps*. La région découverte de la face dorsale de l'idiosoma est aussi densément recouverte de poils dont la longueur oscille entre 56 μ au bord antérieur et 240 μ au bord postérieur où ils sont plus flexibles.

Pattes. — A la seule exception de celles de la 4e paire, toutes les pattes sont robustes, leur flexion ne permettant que des mensurations approximatives. Seule la coxa III présente une épine ventrale, peu robuste, longue de 70 μ. La coxa I a des

poils flexibles et longs, le distal atteint 110 μ et le proximal 220 μ. Le poil antérieur de la coxa II, faible, mesure à peu près 90 μ ; le poil distal est très flexible et long de 220 μ. Le bord antérieur de cette coxa est édenté dès la hauteur du poil antérieur jusqu'à l'épine dorsale qui est très nette. Le poil antérieur de la coxa III est long et rigide et celui de la coxa IV est spiniforme, situé distalement, mesurant 45 μ. Fémur et génual de la patte I portant chacun un long poil distal de 320 μ et d'autres plus courts. Tarse I avec des soies fines ; autres tarses avec des poils forts et rigides, mais sans de véritables épines.

Gnathosoma. — Seulement les *maxillicoxae* et le *labrum* purent être examinés. Les premières se terminent par des *cornuculi* robustes et ont des longs poils, dont le moyen interne est long de 110 μ, le plus développé après lui étant le postérieur qui a 95 μ. Le labrum est plus long que les corniculi et a des bords très velus.

Description d'après six cotypes femelles, montés sur des lames et numérotés 3936, capturés à 3.100 m d'altitude à El Tambo, Département de Piura, Pérou, le 26-4-56, sur un *Oryzomys xanthocolus*.

La dénomination spécifique rappelle la civilisation précolombienne si avancée, dont ses actuels descendants sont, à juste titre, si fiers.

Gigantolaelaps peruvianus Ewing 1933.

C'est la première référence de nouveaux hôtes depuis la découverte de cette espèce. Plusieurs des caractères de *G. peruvianus* rappellent le génotype, *G. vitzthumi*, dont il peut être distingué par sa moindre taille, par la plus faible chitinisation, par les poils plus longs et par une génitale plus dilatée. Les soies latérales et ventrales plus courtes de l'idiosoma et la génitale plus large établissent une séparation avec le *G. comatus* Fonseca, seulement connu par le matériel type, ce qui est aussi le cas pour le *G. brachyspinosus* Fonseca, les deux plus rares espèces du Brésil, toutes les autres étant représentées dans la collection de l'auteur par plusieurs individus ou par de nombreux lots, quelques-unes avec une distribution géographique très étendue.

Voici la liste du matériel reçu du Pérou :

N° 3721, du 17-11-55, sur *Akodon mollis*, de Águas Verdes, Tumbes.
3734, du 13-1-56, sur *Oryzomys xanthocolus* de Águas Verdes, Tumbes.
3739 et 3746, du 15-1-56, sur *Oryzomys xanthocolus* de Isla Matapalo, Tumbes.
3755 et 3758, du 18-11-55, du *O. xanthocolus* de Llampa, Ancash.
3760, du 19-11-55, sur le même hôte et de même provenance.
3770, du 27-11-55, dans le nid de *Phyllotis amicus* de Llampa, Ancash.
3775, du 23-11-55, sur *O. xanthocolus* de Llampa, Ancash.
3780, du 26-1-56, sur *O. xanthocolus* de Papayal, Tumbes.
3787, du 30-1-56, sur le même hôte et de même provenance.
3788, du 8-2-56, sur *O. xanthocolus* de Cascas, Tumbes.
3791, du 3-2-56, sur *O. xanthocolus* de Tumbes.
3796, du 16-2-56, sur *O. xanthocolus* de Cascas, Tumbes.
3800, du 17-2-56, sur le même hôte et de même provenance.

3802, du 19-2-56, sur hôtes de même provenance.
3806, du 20-2-56, sur *Akodon mollis* de Cascas, Tumbes.
3810, du 29-2-56, sur *O. xanthocolus* de Cascas, Tumbes.
3813, du 24-2-56, sur *O. xanthocolus* de Platanal, Tumbes.
3902, du 29-4-56, dans nid de rat sauvage de Huancabamba, Piura.
3927, du 19-4-56, de *Oryzomys flavescens* de Cerro Colorado, Piura.
3934, du 23-4-56, de rats sauvages de El Tambo, Piura.
3953, du 5-5-56, dans nid de *O. longicaudatus* de El Mirador, Piura.
3958, du 7-5-56, de *O. xanthocolus* de El Mirador, Piura.
3959, du 11-5-56, de *O. xanthocolus* de El Sauce, Piura.
3967, du 8-5-56, sur *Sigmodon* (*peruanus* (?)) de El Sauce, Piura.
3969, du 20-5-56, sur *O. xanthocolus* de El Sauce, Piura.

G. peruvianus semble donc avoir avec *G. vitzthumi* une affinité autre que morphologique, celle d'être une espèce oligoxène dont on ne sait pas encore si le nombre d'hôtes s'approche de celui de l'espèce type, lequel est très élevé au nord-est du Brésil, puisqu'il comprend une vingtaine d'espèces.

La distribution verticale de cet acarien est aussi très remarquable puisque du niveau de la mer à Águas Verdes, Département de Tumbes, elle atteint 3.100 m d'altitude à El Tambo ; au Département de Piura, une distribution qui coïncide avec celle de son hôte le plus commun, l'*Oryzomys xanthocolus*.

Eubrachylaelaps rotundus Fonseca 1936.

Parmi les espèces de ce genre *E. rotundus* doit être la dominante en Amérique du Sud, où le genre est moins riche en espèces qu'en Amérique du Nord. Nous l'avons déjà rencontrée au Brésil, où elle présente une distribution étendue, en Bolivie et maintenant au Pérou, où elle avait déjà été trouvée par FURMAN sur l'*Akodon mollis orophilus*.

D'après les captures réalisées par DE LA BARRERA les rats suivants sont ses hôtes au Pérou :

a) *Akodon mollis*, lots N^{os} 3737, 3741, 3742, de Águas Verdes, Tumbes, le 13-1-56 ; N° 3748 de Papayal, Tumbes, 29-1-56 ; N° 3798 de Cascas (Tumbes ?), le 17-2-56 ; N° 3915 de Huancabamba, Piura, le 6-4-56 ; N° 5922 de Tierra Amarilla, Piura, le 9-4-56 et N° 3948 de Canchaque, Piura, le 27-4-56.

b) *Proechymis decumanus*, lot N° 3753 de La Palma, Tumbes, le 21-1-56.

c) *Oryzomys longicaudatus* (nid), lot N° 3913, de Huancabamba, Piura, le 2-4-56.

d) *Oryzomys xanthocolus*, lot N° 3937, de El Tambo, Piura, le 26-4-56.

C'est donc une espèce qui s'adapte aussi bien aux hôtes du niveau de la mer à Águas Verdes, Tumbes et à Bertioga, São Paulo, Brésil, qu'à ceux de El Tambo, Piura, à 3.100 mètres d'altitude.

Haemogamasus pontiger (Berlese).
syn. : *Haemogamasus oudemansi* Hirst 1914.

C'est en toute probabilité la première vérification d'un *Haemogamasidae* en Amérique du Sud, ce qui ne modifie point la situation d'inexistence d'une espèce autochtone en Amérique du Sud, puisqu'il s'agit ici d'un acarien cosmopolite déjà connu d'Europe, d'Afrique du Sud, d'Australie, de Chine et d'Amérique du Nord, l'*Achantochela chilensis* Ewing, 1933 n'appartenant plus aux *Haemogamasidae*, d'après KEEGAN

Cette espèce est un parasite facultatif et semble rare en Amérique du Nord, d'après le magnifique essai monographique des *Haemogamasidae* de Keegan, dans lequel cet acarien est cité comme *Euhaemogamasus oudemansi*. D'après le traité des *Gamasoidea* de l'URSS de BREGETOVA, dans lequel la savante russe étudie en 1956 dix-sept espèces du genre *Haemogamasus* Berlese, l'*Euhaemogamasus oudemansi* (Hirst 1914) et l'*Eulaelaps mansoni* Womersley 1937 sont synonymes de l'espèce ici étudiée.

Cette espèce fut capturée une seule fois à Jacocha, Piura, le 1-4-56 sur un *Mus musculus* et le lot a pris le nº 3908 de notre collection. Sur le même hôte furent trouvés *Rhinolaelaps blumenthali* sp. n. et *Atricholaelaps* nº 3911.

Laelaps echidninus Berlese 1888.

De cet acarien cosmopolite et parasite habituel du *Rattus norvegicus* nous avons obtenu les lots suivants : nºs 3759, 3767, 3768, 3769 et 3772 tous sur des *Rattus norvegicus* à Llampa, Département d'Ancash, les 17, 19 et 28-11-56.

Laelaps paulistanensis Fonseca 1936.

Trouvé une seule fois dans un nid de rats sauvages à Canchaque, Piura, le 26-4-56, ayant reçu le nº 3943.

Deux nouveaux genres à plaques métapodales hypertrophiées.

La rencontre de plaques métapodales (inguinales) très développées est rare, tant chez les espèces libres que chez les parasites. Parmi les premières on se souviendra du genre *Megalolaelaps* Berlese, avec des espèces symphoriques comme le *Megalolaelaps imanis* Berlese dont nous avons eu la chance de décrire le mâle, espèce énorme dont les dimensions rappellent plutôt celles des tiques et qui est le plus grand Acarien non Ixodidé connu. Parmi les parasites le groupement connu est celui des espèces qui constituent le genre *Eulaelaps* Berlese, bien plus riche, avec à peu près deux dizaines d'espèces. L'existence de soies nombreuses sur une plaque génitoventrale très élargie est très caractéristique de ce genre.

Tout récemment TAUFFLIEB et MOUCHET ont décrit un Laelaptidé, capturé sur un rongeur indéterminé de la région du Yaoundé, au Cameroun, dont la plaque génitoventrale est élargie comme chez plusieurs espèces de *Laelaps*, et pour lequel ils proposèrent le nom de *Laelaps yaoundensis*. Il y a toutefois au moins deux caractères qui s'opposent à la conservation de l'espèce de TAUFFLIEB et MOUCHET dans le genre *Laelaps* ; le nombre de soies de l'écusson dorsal et la taille exagérée des plaques métapodales. ZACHVATKIN a établi le nombre de 39 paires pour les poils de l'écusson dorsal comme caractéristique de tous les *Laelaps* de Russie, ce qu'il nous est maintenant possible de confirmer pour les espèces néotropicales et pour plusieurs *Laelaps* d'autres Régions Zoogéographiques, tandis que chez l'espèce du Cameroun ces poils sont au nombre de 50. De telles différences nous incitent à proposer, pour l'espèce de TAUFFLIEB et MOUCHET la création d'un nouveau genre dont la diagnose provisoire serait la suivante :

Camerolaelaps gen. n.

Laelaptidae : plaque génitoventrale très élargie et très rapprochée de la plaque anale, portant quatre paires de poils ; plaques métapodales très développées, comme chez *Eulaelaps* ou *Megalolaelaps* ; écusson dorsal avec une centaine de poils. Génotype : *Laelaps yaoundensis* Taufflieb et Mouchet 1956.

L'autre genre nouveau avec des plaques métapodales très développées est, au contraire du précédent, néotropical et son génotype est connu dès 1935.

Rhinolaelaps gen. n.

On connaît déjà dix-sept espèces appartenant au genre *Eulaelaps* Berlese 1903 originaires d'Europe, d'Asie et d'Amérique du Nord ; une seule ayant été trouvée dans la Région Néotropicale, *Eulaelaps vitzthumi* Fonseca 1935, jusqu'ici signalée seulement de São Paulo, Brésil. Quand nous avons décrit cette espèce nous n'avons eu aucun doute pour la placer dans le genre *Eulaelaps*. Nous n'avons néanmoins pas oublié d'attirer l'attention sur un caractère qui ne fut jusqu'ici observé dans aucune espèce de l'Ordre, et consistant en l'existence d'un organe sensoriel capsulé placé dans le bord interne du premier segment des palpes, rappelant au premier abord l'organe de Haller, du tarse I des *Ixodides*, se rapprochant encore plus de l'organe de Blumenthal des Araignées.

En faisant l'étude minutieuse de l'organe de Haller en 1941, Paul SCHULZE nia l'existence de tout autre organe capsulé semblable chez les Acariens, oubliant que nous avions décrit l'organe palpal dès 1935 et que l'organe de Haller existe aussi chez les *Notostigmata*.

En rencontrant maintenant ce qui devaient être la seconde et la troisième espèces néotropicales du genre *Eulaelaps*, nous avons pu constater la même caractéristique, qui distingue donc les espèces sud-américaines des nords-américaines,

européennes et asiatiques. Il est vrai que n'ayant pas examiné les types de ces espèces nous ne pouvons nier l'existence d'un tel organe chez elles. Néanmoins il n'est pas croyable que sa présence n'eut pas frappé l'attention de BERLESE, BANKS, VITZTHUM, TURK, RADFORD et de bien d'autres savants ayant étudié des espèces d'*Eulaelaps*.

Vingt ans s'étaient écoulés lorsque le Dr. J. M. DE LA BARRERA nous communiqua un acarien semblable, capturé par lui à Padilla, Bolivie, dans le nid d'un rat appartenant probablement à *Oryzomys* sp., un autre lot provenant d'un *Oxymycterus doris* de Valleabajo, également en Bolivie ; les différences spécifiques avec l'*Eulaelaps vitzthumi* consistant principalement dans la moindre densité du revêtement pileux de l'écusson dorsal et dans la forme et le réticule de la plaque inguinale. Un mâle était présent dans ce matériel. La même espèce nous fut communiquée par DE LA BARRERA du Pérou, nous allons la décrire en nous basant sur la femelle ; le mâle bolivien attendra la publication du travail où sera décrit le matériel de Bolivie.

Le même inlassable fournisseur d'un si précieux matériel acarologique nous communique maintenant une autre espèce capturée cette fois seulement au Pérou, laquelle diffère des précédentes surtout par le réticule des plaques inguinales, par sa très large plaque anale, par les plus larges peritrematalia et par l'absence, dans l'organe palpal, des septes présentés par les deux autres espèces connues, cet organe semblant formé par une chambre unique.

L'existence d'une unique espèce portant un tel organe pouvait être jugée insuffisante pour la création d'un nouveau genre, mais la présence, dans la même Région Zoogéographique, de trois espèces ayant un caractère identique vient prouver l'existence d'un groupement qui s'est différencié dans le temps comme dans l'espace, en justifiant la proposition d'une nouvelle unité de la systématique.

Dans la présomption que cette formation existant au premier segment des palpes représente un organe sensoriel, peut-être olfactif, au même titre que ses homologues, l'organe de Haller et celui de Blumenthal, nous proposons pour le nouveau genre le nom de *Rhinolaelaps* gen. n.

Diagnose de *Rhinolaelaps* gen. n. — *Laelaptidae* avec les caractères d'*Eulaelaps* Berlese 1903 et présentant au premier segment des palpes un organe sensoriel capsulé dont l'aspect rappelle celui des organes de Haller des Ixodidés et de Blumenthal des Araignées. Génotype : *Eulaelaps vitzthumi* Fonseca 1935.

Rhinolaelaps halleri sp. n. (Fig. 3 à 5).

Femelle de taille un peu plus petite que celle du génotype, ses poils faibles et moins nombreux. Les pattes sont minces et les mandibules robustes.

Idiosoma.

Ovoïde, plus étroit à sa partie antérieure, sans épaules, 1.330 μ de long et large de 840 μ derrière la quatrième paire.

Face ventrale. — Tritosternum pileux dès sa base, les poils des deux bras placés à une distance considérable les uns des autres. Plaque sternale réticulée, plus large que longue, 130 μ de long à la ligne médiane et 190 μ dans sa plus petite largeur, avec trois paires de poils lisses, les antérieurs un peu plus petits et les moyens et postérieurs sub-égaux, longs d'environ 90 μ. Le bord antérieur est presque droit et se confond avec la plaque prosternale plus faiblement chitinisée et se terminant au bord du gnathosoma. Le bord postérieur est concave ; les soies postérieures sont placées à une certaine distance des bords. Les plaques métasternales sont peu différenciées et la plaque génitoventrale est plus large un peu en arrière de son milieu où elle atteint 430 μ. Son bord postérieur semble un peu concave. La surface est réticulée et présente à peu près 15 paires de soies lisses, 10 autres paires étant marginales dont deux au bord postérieur. La plaque anale reste à une distance d'environ 10 μ du bord de la génitoventrale, elle est longue de 110 μ et large de 136, l'anus est situé à une faible distance du bord antérieur, les soies longues de 68 μ les antérieures plus rapprochées de l'anus que des bords et situées entre l'extrémité postérieure et le milieu de l'anus. Plaques inguinales ovoïdes, allongées, longues de 112 μ et larges de 54, la partie postérieure effilée, avec un réseau de sept mailles larges. La surface ventrale découverte est modérément pileuse. Stigmates au niveau de l'intervalle entre les coxae III et IV et péritramatalia atteignant en arrière le bord postérieur de la coxa IV et en avant le bord antérieur de la coxa I, le péritrème atteignant cette coxa.

Face dorsale. — L'écusson est presque de même longueur que l'idiosoma et laisse une bande latérale étroite découverte. La surface est réticulée, les poils abondants mais moins serrés que chez le *Rhinolaelaps vitzthumi*. L'unique paire de soies verticales sont les plus robustes de tous les poils, mesurant 70 μ comme les plus longues soies. Il n'y a pas de soies plus longues postérieures, ni de paire sub-médiane plus courtes comme chez les *Laelaps* (M_{11} et D_8 de ZACHVATKIN), toutes ces soies étant sub-égales et généralement lisses.

Pattes. — Seules celles de la quatrième paire sont plus robustes et seule la coxa I est longue ; toutes les autres étant courtes et portant des soies minces. Les tarses I et IV sont très longs, mesurant respectivement 290 et 335 μ. Toutes les pattes terminées par des *pulvilli* et des angles faibles. Aucune formation aux tarses rappelant celles des palpes.

Gnathosoma.

C'est précisément le gnathosoma qui a permis de séparer ce petit groupe des *Eulaelaps* auxquels il reste néanmoins étroitement rattaché.

Les *maxillicoxae* dont les soies sont longues et fines, l'externe médiane plus courte, se terminent par des *corniculi* robustes. La *rima hypopharyngis* est large et présente onze séries de petites dents. Les palpes ont le premier segment un peu plus long et portent, dès la base de leur bord interne jusqu'à une petite distance de l'extrémité distale, l'organe caractéristique du genre et déjà décrit chez *Rhino-*

laelaps vitzthumi (Fonseca 1935). Cet organe n'occupe pas toute l'épaisseur du segment palpal et est formé d'une capsule allongée, divisée par cinq larges cloisons, de même structure chitineuse que la paroi de la capsule, en cinq chambres de taille à peu près égale, lesquelles semblent isolées de l'extérieur par une fine membrane. Au niveau des deux premières chambres il y a, du côté de la face dorsale, un feuillet membraneux externe qui semble se terminer en une pointe dirigée en avant dont la

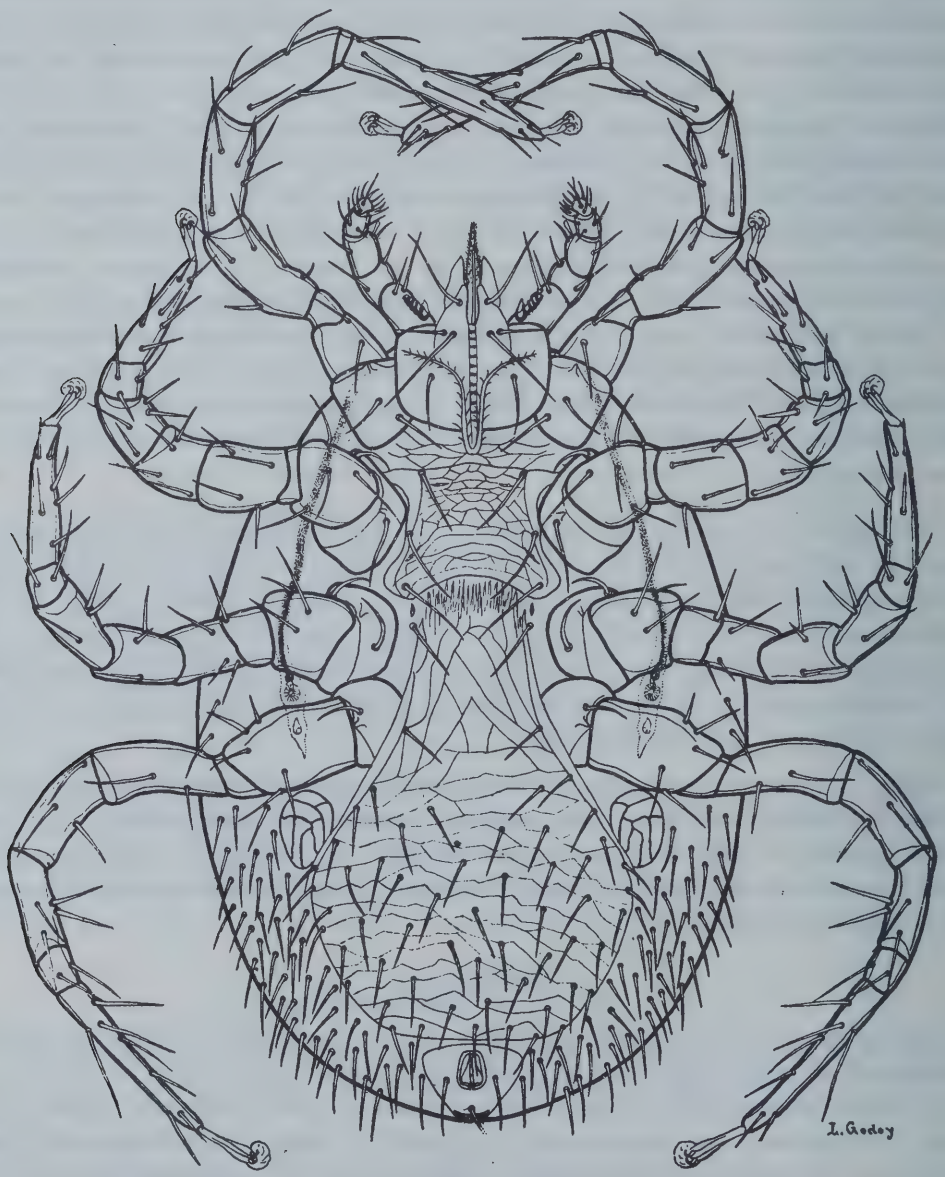


FIG. 3. — *Rhinolaelaps halleri* sp. n. ♀

projection au dessin donne l'impression d'une épine telle que chez *Rhinolaelaps vitzthumi*. A l'intérieur des chambres il n'y a pas de poils sensoriels tels que ceux décrits par SCHULZE dans l'organe de Haller des *Ixodides* ; des touffes de poils antérieure et postérieure ou une sécrétion interne, comme dans l'organe de Haller,

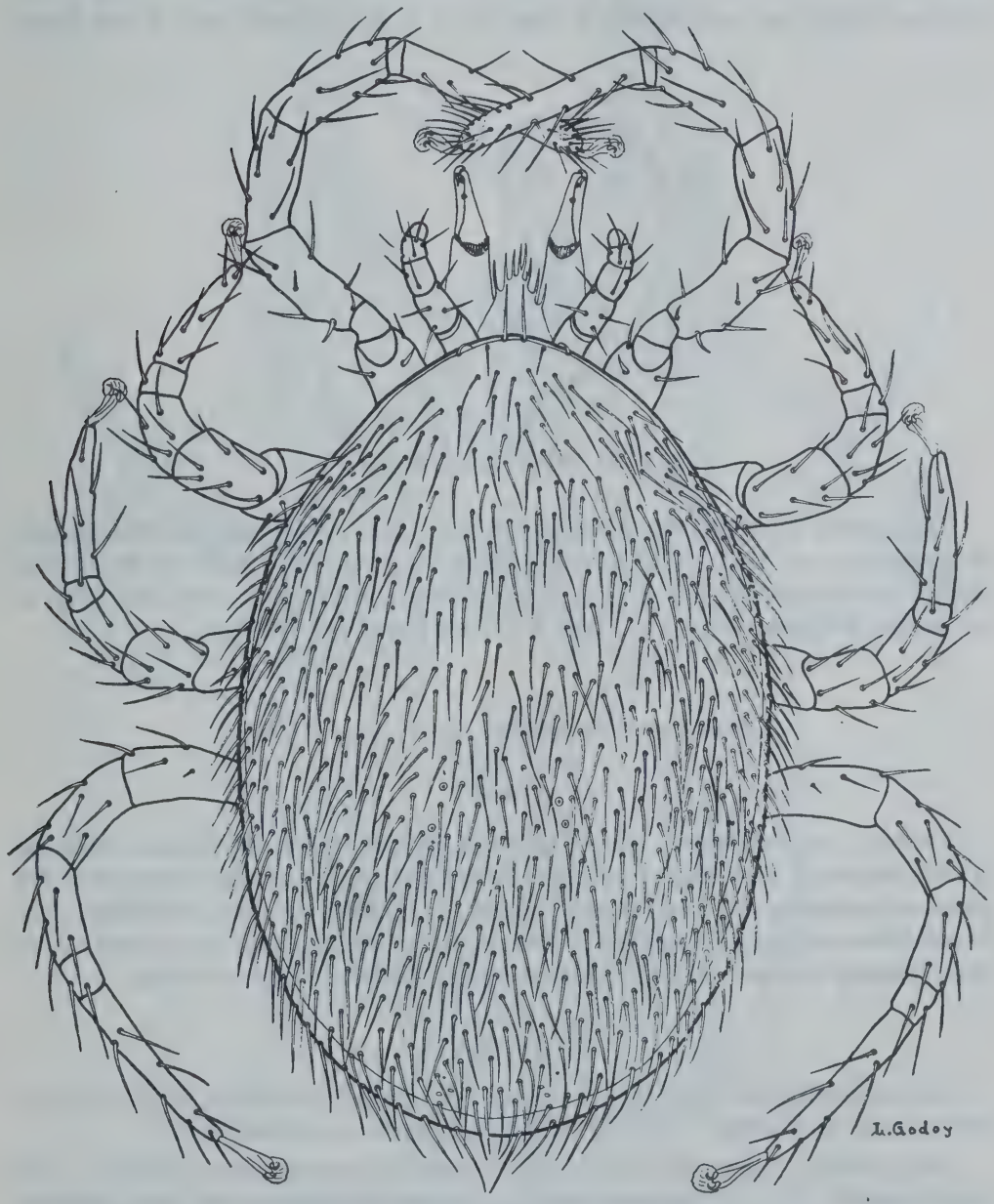


FIG. 4. — *Rhinolaelaps halleri* sp. n. ♀.

n'existent pas dans cet organe des palpes. Le labre est fin et pileux ; les *lasciniae* ont des poils excessivement courts. Les *stylli* sont robustes et semblent canaliculés. Trochanter et fémur des mandibules très élargis, la dernier atteignant 80 μ de large ; *pulvilli* de soies courtes à la base du doigt mobile et soie simple et plus longue à la base du doigt fixe. Chacun des doigts, mesurant 110 μ, présente deux dents, en plus de celles des extrémités et le doigt fixe a un *pilus dentilis* court et non élargi.

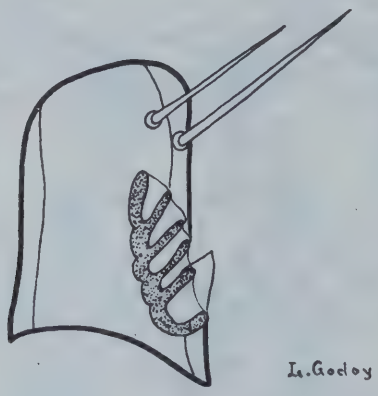


FIG. 5. — *Rhinolaelaps halleri* sp. n. ♀.

Description d'une femelle holotype nº 3910, capturée, à côté du *Rhinolaelaps blumenthali* n. sp., sur un *Mus musculus* par le Dr. J. M. DE LA BARRERA à Jacocha, Département de Piura, Pérou, le 1-4-56. L'espèce a été aussi trouvée en Bolivie et les dessins ici présentés ont été faits à l'aide du matériel bolivien.

Rhinolaelaps blumenthali sp. n. (Fig. 6 à 8).

Femelle.

Délicate, sa chitinisation étant faible ; la pilosité très serrée rappelle celle des *Haemogamasidae*, dont elle se distingue facilement par les grandes dimensions des plaques inguinales, qui ressemblent à celles des espèces du genre *Eulaelaps*, avec lequel *Rhinolaelaps* a plusieurs points communs. Une femelle, avec un œuf non encore embryonné et presque elliptique, mesurait 518 μ de long et 380 μ de large.

Idiosoma.

Très régulièrement elliptique, 1130 μ de long, un peu plus large derrière la quatrième paire où il atteint 730 μ. Il n'y a pas d'épaules ni de longs poils.

Face ventrale. — La surface de la plaque sternale est ponctuée et réticulée, cette plaque mesure 140 μ de longueur sur 186 μ de moindre largeur, son bord antérieur est presque droit et le bord postérieur légèrement concave avec ses angles très

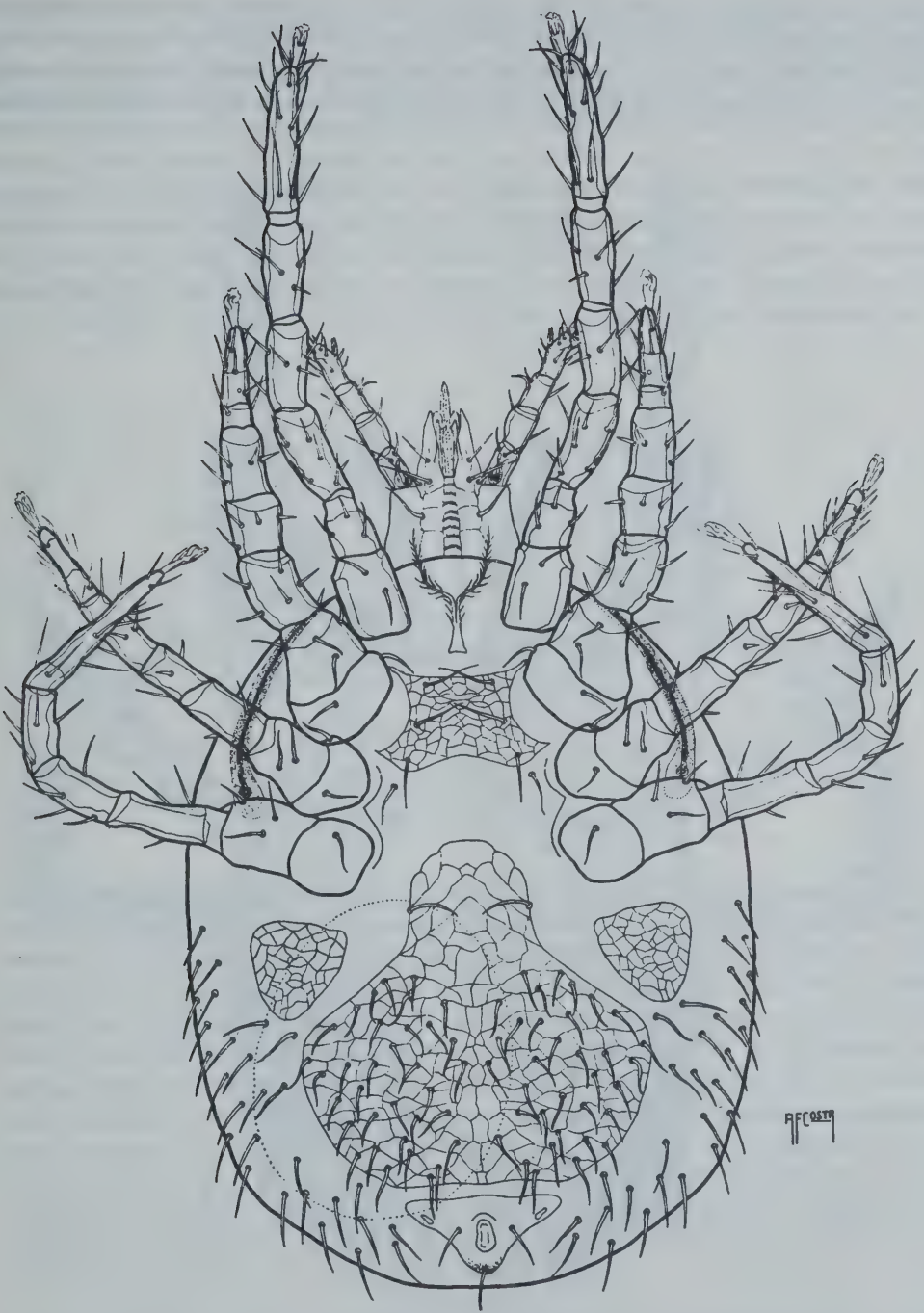


FIG. 6. — *Rhinolaelaps blumenthali* sp. n.

prononcés. Les poils antérieurs sont longs de 94 μ et séparés par un intervalle de 118 μ, leur implantation coïncidant avec le bord antérieur. Les poils moyens et les postérieurs sont sub-égaux, insérés un peu en avant des bords et longs de 108 μ. Tous ces poils sont fins et lisses. La plaque génito-ventrale est extraordinairement

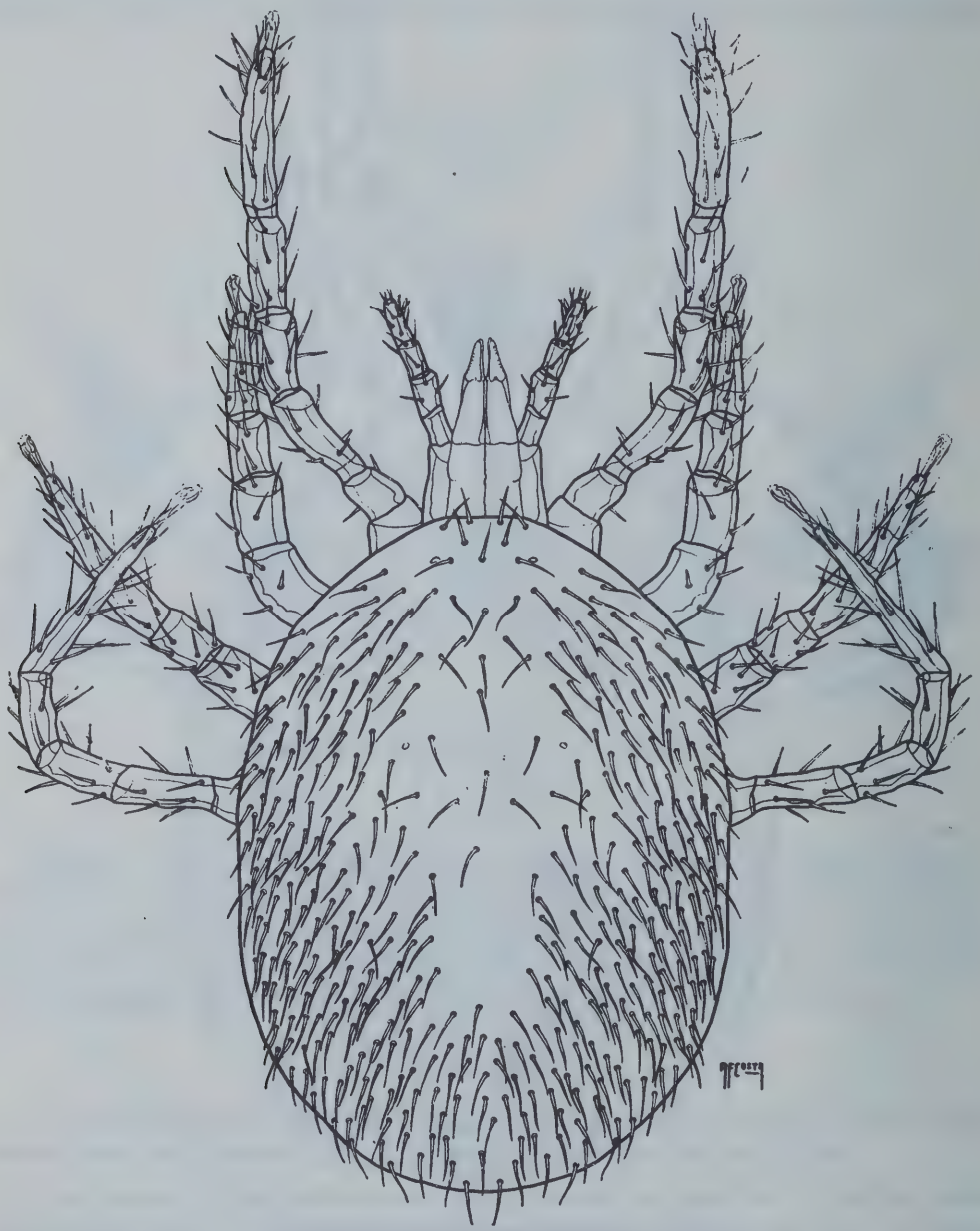


FIG. 7. — *Rhinolaelaps blumenthali* sp. n.

élargie, comme chez les autres espèces du même genre et atteint sa plus grande longueur à la ligne moyenne où elle est large de 588 μ, donc à peu près de 130 μ de plus que chez le *R. halleri* Fonseca. Cette plaque est très rapprochée de la plaque anale, l'intervalle étant de 25 μ, et elle présente une surface réticulée. Les poils génitaux sont longs de 87 μ ; il y a encore plus de 70 poils dont la longueur varie de 72 à 82 μ, aucun n'étant inséré directement au bord postérieur. Les plaques inguinales sont énormes, triangulaires, longues de 165 μ et larges de 126 μ, donc beaucoup plus larges que celles des deux autres espèces jusqu'ici connues, le nombre d'éléments du réseau réticulaire étant aussi très élevé, atteignant quelques dizaines. La plaque anale est aussi typique pour cette espèce par rapport à sa largeur qui atteint 255 μ pour 115 μ de long ; la même plaque chez *R. halleri* Fonseca atteint seulement 154 μ

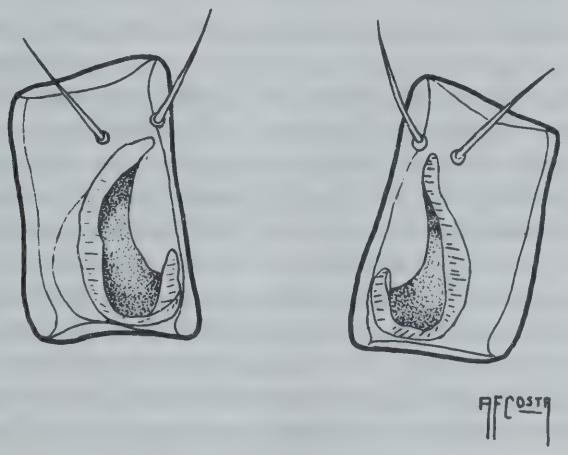


FIG. 8. — *Rhinolaelaps blumenthali* sp. n.

dans sa plus grande largeur, ce qui permet de distinguer immédiatement les deux espèces. L'orifice anal, dont la forme est circulaire, est très rapproché du bord antérieur de la plaque ; le poil postérieur, qui est long de 72 μ est un peu plus petit que les latéraux, qui sont longs de 90 μ et dont l'insertion est à peu près au même niveau que le milieu de l'orifice anal. La surface ventrale découverte ne présente que de rares poils lisses. Le stigmate est en situation normale et les péritrèmes sont visibles jusqu'au bord postérieur de la coxa II. Les péritrematalia, qui ont une longueur moindre de 72 μ derrière le stigmate, se terminent en une extrémité postérieure élargie derrière la coxa IV. Dans cette région on distingue un orifice large et arrondi d'un diamètre de 30 μ, donc plus grand que le stigmate qui est large de 20 μ. Le tritosternum est pileux dès sa bifurcation, située à 58 μ de la base. L'existence d'une pré-sternale est indiquée par la réticulation vue dès le bord antérieur de la sternale jusqu'au tritosternum.

Face dorsale. — Écusson recouvrant presque toute la surface dorsale, long de 1370 μ et large de 850 μ. Des soies verticales, les antérieures (F_1 de ZACHVATKIN)

sont un peu plus robustes et les postérieures (F_3) quelque peu plus longues. Il y a à peu près 300-400 soies sur l'écusson ; les différences de taille ne sont pas remarquables, même pour les soies marginales postérieures.

Pattes.

Pattes I et IV longues et fines et pattes II et III légèrement élargies, principalement les coxae et les trochanters II. Il n'a pas d'épines aux pattes dans lesquelles on peut d'ailleurs trouver des poils forts, rigides et longs, principalement aux tarses.

Gnathosoma.

Les soies postérieures et moyennes internes des maxillicoxae sont sub-égales et plus longues que les deux autres, lesquelles sont aussi sub-égales. *Rima hypopharyngis* très longue, pouvant présenter de 8 à 15 petites dents aux séries médianes. *Corniculi* forts sans exagération. *Labrum* et *Lasciniae* fins, pileux. Mandibules pourvues d'un *pulvillus* de soies très courtes à la base du doigt mobile et d'un poil court et fort à la base du doigt fixe, lequel présente un *ptus* non dilaté. L'épistoma rappelle celui des *Haemogamasidae*, avec à peu près cinq rameaux de chaque côté. L'organe du palpe, au contraire de ce qu'on observe chez *R. vitzthumi* et *R. halleri*, ne présente pas de cloisons ; il est constitué par une unique chambre sans aucune formation interne, occupant à peu près la moitié de la longueur et de la largeur du premier segment des palpes. On s'aperçoit que la paroi qui le revêt est striée et qu'il existe à la base la même membrane saillante déjà décrite dans les deux autres espèces. Rien de plus n'a été observé, même après examen à l'immersion en contraste de phase.

Décrit d'après un holotype femelle du lot 3909 récolté à Jacocha, Piura, au Pérou, sur *Mus musculus*, le 1-4-56, par le Dr. J. M. DE LA BARRERA. Mâle et jeunes inconnus. Le nom spécifique est proposé en hommage à BLUMENTHAL qui décrivit l'organe semblable chez les araignées. Dessin d'après un paratype. Deux paratypes femelles du même lot reçurent le n° 5670. Au même lot appartient une femelle holotype du *Rh. halleri* sp. n., montée sur lame n° 3910, espèce trouvée aussi en Bolivie. La rencontre des deux espèces au même endroit et sur le même hôte démontre leur identité écologique et éthologique.

Mysolaelaps parvispinosus Fonseca 1935.

L'espèce rencontrée au Pérou est la plus répandue parmi les trois espèces de ce curieux genre, ayant déjà été trouvée au Brésil et en Bolivie. Dans la récolte faite au Pérou, le *Mysolaelaps parvispinosus* fut capturé une seule fois, à Canchaque, Piura, le 26-4-56, dans un nid de rats sauvages, à côté de *Laelaps paulistanensis*, *Eubrachylaelaps rotundus* et *Ischnolaelaps glasgowi* et fut enregistré au lot n° 3946.

Le matériel ayant été recueilli dans le nid on pouvait s'attendre à y rencontrer

aussi des mâles, jusqui'ci inconnus dans ce genre, ce ne fut pas le cas, l'inexistence de mâles semblant ainsi une fois de plus prouvée ; l'absence concomitante de jeunes dans le même nid vient toutefois invalider presque complètement cet argument. Chez les jeunes, que je ne pus jusqu'ici observer qu'à l'intérieur de l'hysterosoma des femelles gravides, les poils de l'écusson dorsal sont très longs, au contraire de ce qu'on observe chez les femelles.

Atricholaelaps (Ischnolaelaps) glasgowi (Ewing 1925).

Nous avons eu l'occasion de discuter, dans un travail antérieur, des raisons pour lesquelles nous nous sommes décidé pour la conservation du genre *Atricholaelaps* Ewing 1929 divisé dans les deux sous-genres *Atricholaelaps* et *Ischnolaelaps*, au lieu de les considérer tous deux comme synonymes d'*Haemolaelaps* Berlese selon l'habitude actuelle.

Cette espèce qui apparaît dans la littérature moderne sous le nom d'*Haemolaelaps glasgowi* et qui présente une importante synonymie, semble être, parmi les acariens parasites, une de celles qui ont une distribution des plus vaste, à peu près aussi grande que son indifférence à l'égard des nombreux hôtes sur lesquels elle a déjà été signalée. Dans la Région Néotropicale nous l'avons déjà trouvée au Brésil et en Bolivie ; au Pérou elle s'est montrée fréquemment et avait déjà été rencontrée en 1948 à Cacachara, Ilave, sur quatre hôtes différents. Nous possédons de nombreux lots exclusivement constitués par des femelles, les mâles semblant être très rares ainsi que les nymphes.

Au Pérou cet acarien a été capturé dans les localités et sur les hôtes suivants : *Phyllotis arenarius*, *Punomys lemninus*, *Auliscomys boliviensis* et *Cheomys pulcherrimus* de Cacachara, Ilave, tous signalés par STRANDTMANN.

Atricholaelaps (Ischnolaelaps) barreral sp. n.

Outre *A. (I.) glasgowi* et *A. (I.) chinchillulae* (Strandtmann) dont les recherches de STRANDTMANN avaient déjà prouvé l'existence au Pérou, ce qui a été confirmé par nos observations au sujet de la première de ces espèces, un autre acarien du même genre va être rapidement étudié.

Il s'agit d'un *Ischnolaelaps* proche du *A. (I.) geomys* (Strandtmann 1949) et s'en distinguant surtout par la patte II plus élargie, par le contour de la plaque anale, dont les bords latéraux semblent légèrement concaves, ce qui la rend un peu effilée, et par l'absence du faisceau pileux labial, si caractéristique dans l'espèce nord-américaine de STRANDTMANN. Dans la région où elle a été capturée l'espèce est plus fréquente sur les rongeurs que le *A. (I.) glasgowi*.

Voici la liste des hôtes et des localités d'où elle nous est parvenue : *Akodon mollis* de Cascas, Huancabamba, Tierra Amarilla et Canchaque ; *Mus musculus* (nid) de Jacocha, Piura ; *Oryzomys flavescens* (nid), *Oryzomys longicaudatus* (nid) et *Thomasomys hydsoni* de Huancabamba ; *Oryzomys xanthaeolus* de Isla Matapalo,

Tumbes ; Llampa, Ancash ; El Tambo, et El Sauce, Piura ; Cascas et Platanal, Tumbes (?) ; *Phyllotis amicus* (nid) et *Rattus norvegicus* de Llampa, Ancash ; *Sigmodon peruanus* de El Sauce ; Rat sauvage de Sauce Cahiquito.

Bdellonyssus lutzi Fonseca.

La rencontre de cette espèce sur à peu près 30 rongeurs parmi 75 trouvés infestés par des acariens démontre combien elle est fréquente au Pérou.

Voici la liste des hôtes sur lesquels cet acarien fut capturé, seul ou associé : 3924 et 3723 sur *Rattus rattus alexandrinus* de Thierra Amarilla ; 10-4-56, de Tumbes, 12-1-56 ; 3725 et 3728 sur *Proechimys decumanus* de Águas Verdes, 20-1-56 ; 3730 et 3736 sur *Akodon mollis* de Águas Verdes, 8 et 13-1-56 ; 3733 et 3820 sur *Proechimys decumanus* de Águas Verdes, 13 et 17-1-56 ; 3750, 3752, 3765 et 3779, sur *Proechimys decumanus* de Pocitos, Tumbes, 25-1-56, de La Palma, 20-1-56 et de Águas Verdes, 10 et 28-1-56 ; de Papayal, 30-1-56 ; 3773 et 3951 de *Rattus norvegicus* de Llampa, 28-1-56 et de El Mirador, 5-5-56 ; 3781, 3803 et 3805 de *Oryzomys xanthaeolus* de Papayal, 28-1-56 et de Cascas, 19 et 20-2-56 ; 3789 en nid du rat sauvage, Cascas, 8-11-56 ; 3792 et 3926 sur *Cavia porcellus* (domestique), Cascas, 8, 9 et 11-2-56 et de Cajas, 19-4-56 ; 3795 sur *Rattus rattus* à Cascas 10-2-56.

La présence d'une épine au premier segment des palpes rapproche cette espèce du *Bdellonyssus monteroi* Fonseca et du *B. haematophagus* Fonseca, du Brésil et de *B. vitzthumi* Fonseca, du Brésil et de la Bolivie, du *B. hirsti* Fonseca, d'Argentine, du *B. bursa* Berlese, espèce tropicale et la distingue du *B. bacoti* (Hirst), qui n'a été signalé au Pérou que par MACHIAVELLO en 1956.

La rencontre de cette espèce tant sur des rats sauvages que sur *Rattus norvegicus* et *Rattus alexandrinus*, aussi bien que sur le cobaye montre qu'elle doit dorénavant être incorporée parmi les vecteurs potentiels des parasites des rats et comme d'emploi possible sur des cobayes en laboratoire. Sa rencontre sur des humains au Pérou doit être une question de temps, comme le montre son existence sur des animaux tant domiciliés, au sens de HOARE, que domestiqués.

Bdellonyssus viscaccia, sp. n. (Fig. 9 à 12).

Cette espèce présente des caractères qui permettent de la distinguer aisément de toutes les espèces congénériques. Les modifications observées dans la plaque sternale des *Macronyssidae*, avec la seule exception de l'organe trouvé chez *Lepronyssoides* Fonseca et *Hirstesia* Fonseca, portent sur le bord postérieur qui peut avancer la plaque devenant réduite et ne portant que deux paires de poils comme chez *Ornithonyssus* Sambon, *Ophionyssus* Mégnin, *Neoliponyssus* Ewing, *Chiroptonyssus* Augustson et *Neoichoronyssus* Fonseca, ou qui est épaisse comme chez *Bdellonyssus hematophagus* Fonseca et *Steatonyssus joaquimi* Fonseca. La rencontre, au Pérou et en Bolivie, d'une espèce dont le bord antérieur a perdu sa chitinisation sur toute son étendue, en reculant jusqu'aux *pori repugnatori* antérieurs, représente donc une surprise pour qui étudie cette famille.

Femelle.

L'espèce est plus étroite que la plupart des *Bdellonyssus*. La couleur est plus claire et la chitine moins épaisse.

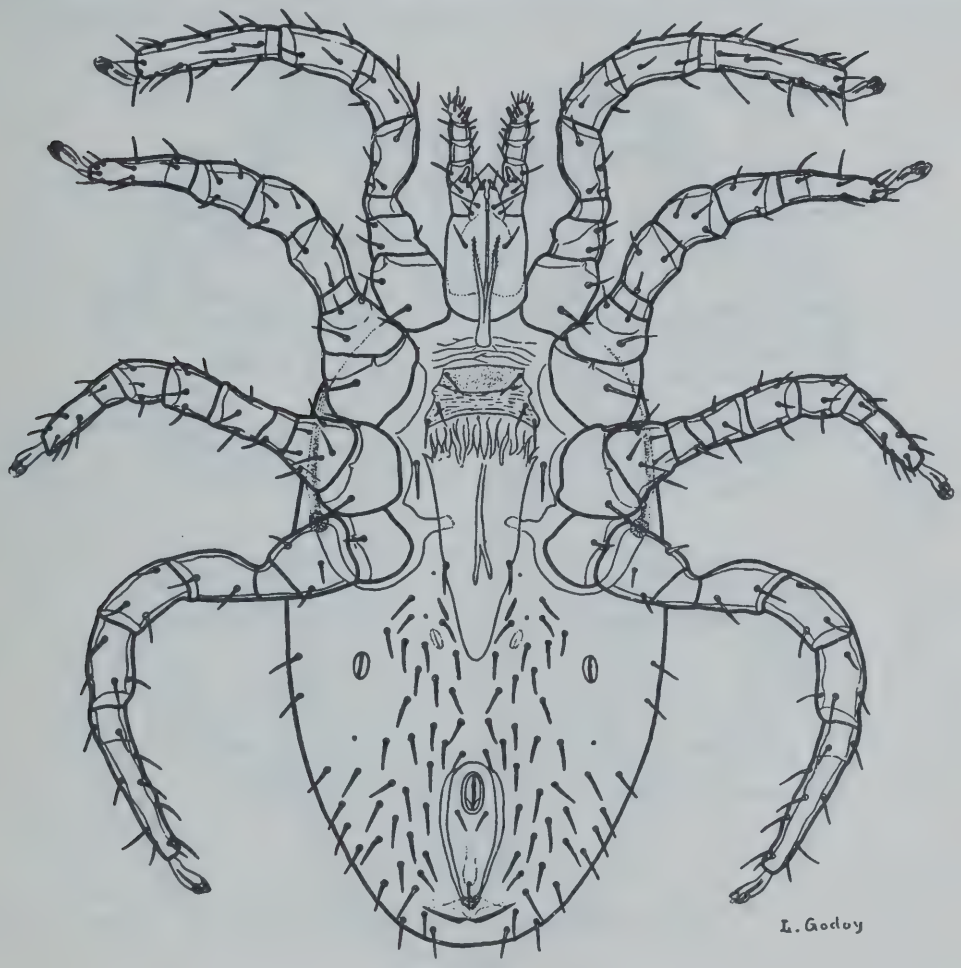


FIG. 9. — *Bdellonyssus viscaccia* sp. n. ♀.

Idiosoma.

Longueur 785 μ et plus grande largeur 504 μ dans l'holotype déjà nourri. La plaque sternale est devenue typique par suite de la partie de la chitine dans le tiers antérieur dès le niveau des pores, cette région se présentant ponctuée. Longueur de la plaque à la région moyenne 64 μ jusqu'au bord de la région antérieure privée de chitine, et de 36 μ derrière cette région ; moindre largeur à peu près 90 μ. Le

bord postérieur est concave. Les soies sont à peu près égales, mesurant 45 μ. Plaque génitale effilée mais à son extrémité mousse portant une paire de soies de 50 μ. Plaque anale allongée, mesurant 147 μ de long sur 79 μ de large, les soies antérieures et les postérieures sub-égales, atteignant à peu près 28 μ. Sur la face ventrale découverte, il y a, de chaque côté, environ 36 soies lisses, de 35 à 45 μ de longueur.

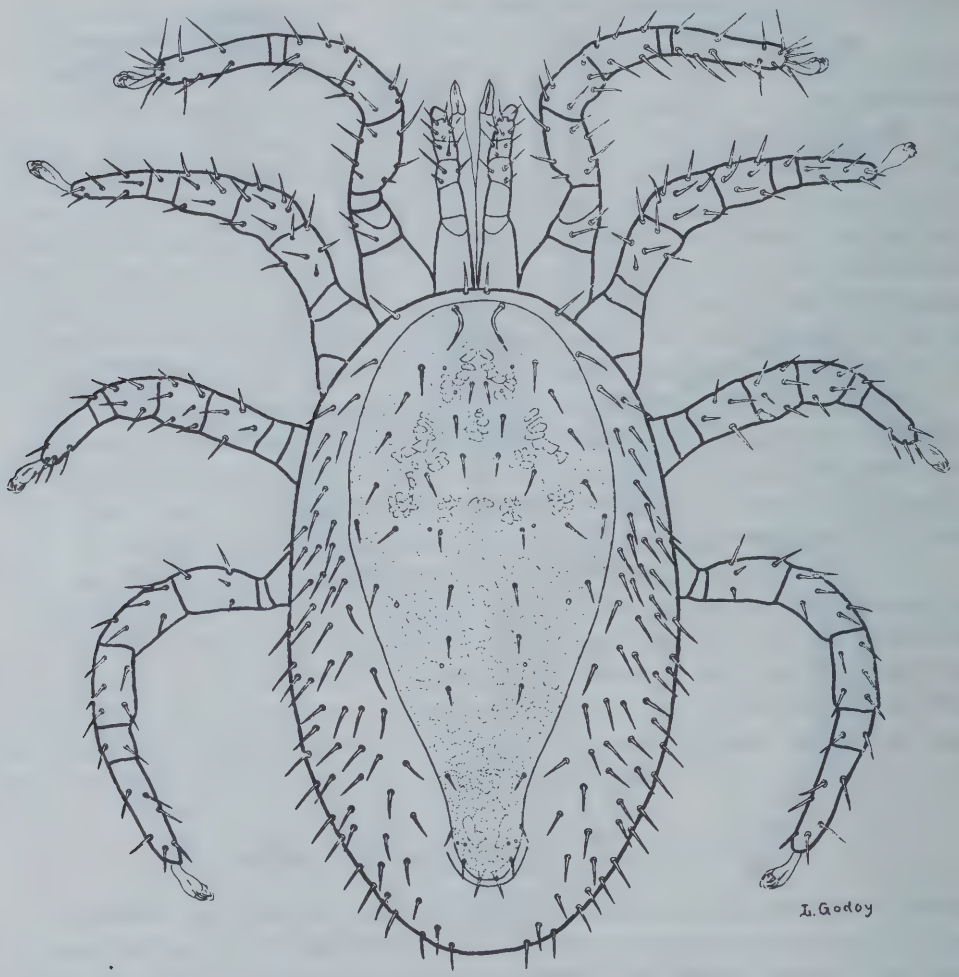


FIG. 10. — *Bdellonyssus viscaccia* sp. n. ♀.

Face dorsale. — L'écusson dorsal la recouvre complètement jusqu'au niveau de la coxa II, d'où il commence à devenir plus étroit pour se rétrécir brusquement au 5e postérieur, sa pointe mousse est au niveau de la plaque anale. Il est long de 756 μ. La surface, réticulée, présente une « sculpture » plus claire et des poils courts dont le nombre et la disposition sont ceux du genre *Bdellonyssus*. Les poils verticaux sont disposés en deux paires dont la postérieure (F_3 de ZACHVATKIN) et les soies

de la paire suivante (V de ZACHVATKIN) sont les plus longs et mesurent 40 μ. Les plus petites soies sont celles de la paire antérieure du groupe de trois soies marginales postérieures de l'écusson (D_7 d'après BREGETOVA) dont la longueur ne doit pas dépasser 15 μ. La soie minuscule généralement située entre D_7 et D_8, qui serait d'après BREGETOVA la S_8, n'existe pas dans cette espèce. Dans la surface découverte il y a environ 30 soies lisses de chaque côté.

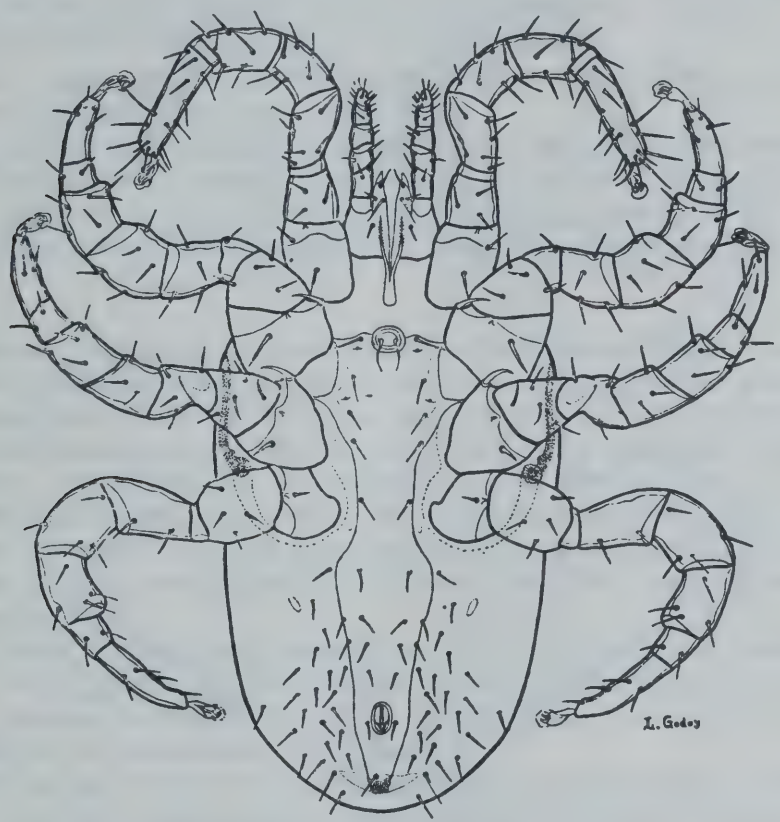


FIG. 11. — *Bdellonyssus viscaccia* sp. n. ♂.

Gnathosoma.

Des poils des *maxillicoxae* les antérieurs sont les plus petits et les moyens internes sont les plus longs. La *rima hypopharyngis* a environ 9 petites dents disposées en une série longitudinale. C'est l'épine interne de la région apicale du premier segment des palpes qui donne au gnathosoma sa physionomie particulière, puisqu'il est bien plus long et fin que l'habitude dans ce genre, mesurant à peu près 22 μ de long et 5 μ de large dans sa base.

Pattes.

Il n'y a dans les pattes aucune particularité digne d'attention. Les segments des pattes I et IV sont plus longs. La soie de la coxa est la plus mince et l'épine dorsale de la coxa II est difficile à découvrir.

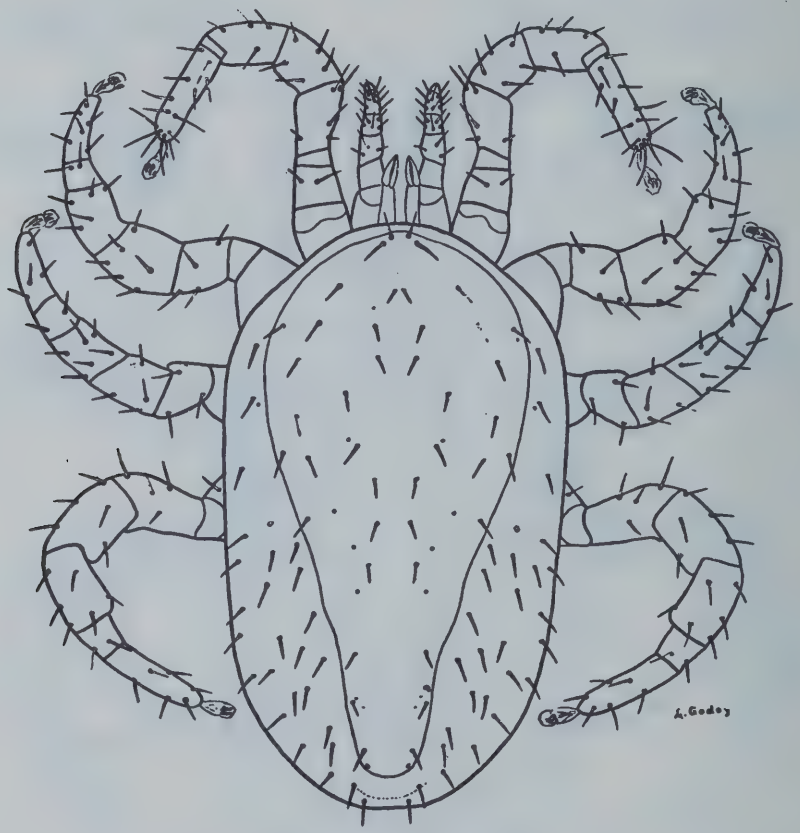


FIG. 12. — *Bdellonyssus viscaccia* sp. n. ♂.

Mâle.

Le mâle est plus petit, n'a pas d'épine au palpe et la région sternale antérieure n'est pas sans chitine comme chez la femelle.

Idiosoma. Face ventrale. — La plaque holoventrale est indivise comme chez les autres *Bdellonyssus*, présente une légère dilatation à la région ventrale et une certaine constriction au point où elle se fusionne avec la plaque anale. Au contraire de ce qui est observé chez la femelle, la région sternale est bien chitinisée, l'organe mâle faisant saillie au bord antérieur. Ses soies sont sub-égales et on voit à peu

près 11 soies irrégulièrement disposées entre les soies génitales et la région anale dont les soies sont plus petites. Les péritrèmes n'atteignent pas la hauteur du milieu de la coxa II.

Face dorsale. — L'écusson dorsal ne se rétrécit pas si brusquement que celui de la femelle. Les soies sont courtes, les verticales étant les plus longues.

Gnathosoma. — L'examen minutieux ne fut pas possible. Les mandibules sont modifiées, un des doigts étant beaucoup plus fort et plus long. A la place de l'épine du premier segment des palpes il n'y a qu'une soie mince.

Pattes. — Celles de la première et de la quatrième paire sont les plus longues, les soies de la coxa III étant les plus robustes.

Décrit de l'holotype femelle et d'un mâle allotype numérotés 3942, récoltés sur *Lagidium viscaccia* à El Tambo, Piura, Pérou, à 3.100 mètres d'altitude, le 26-4-56. L'espèce a déjà été vue par l'auteur sur le même hôte provenant de Bolivie. Les dessins ont été exécutés d'après du matériel bolivien. N° 3523 de notre collection.

Connaissant parfaitement les difficultés de l'orientation d'un service volant de récolte de matériel parasitologique en campagne, l'auteur s'avoue particulièrement reconnaissant au Dr. J. M. DE LA BARRERA pour l'opportunité de pouvoir étudier le matériel qu'il est parvenu à obtenir pour l'Oficina Sanitaria Panamericana et qu'il lui a communiqué par l'intermédiaire du Dr. Oswaldo SILVA.

L'auteur tient encore à remercier J. M. KOHLS du Laboratoire des Montagnes Rocheuses à Hamilton, Montana, pour son opinion sur la validité de l'*Ornithodoros aragaoi* et pour son avertissement sur l'existence possible d'une deuxième espèce dans le même lot.

A son élève, la biologiste Carmen VILLANUEVA R., du Servicio Nacional de Erradicación de Malaria, de Lima, Pérou, qui a bien voulu, pendant son séjour au Brésil, faire une minutieuse révision du manuscrit pour y compléter les données géographiques, un remerciement très amical.

A Marc ANDRÉ qui l'a invité à collaborer dans sa magnifique revue *Acarologia*, et à son jeune ami Joseph GÉARA la reconnaissance de l'auteur pour leurs soins dans la correction linguistique.

BIBLIOGRAPHIE

ARAGAO (H.) e FONSECA (F. DA). — Confirmação de *Ixodes aragaoi* Fonseca 1935, de *Ixodes amarali* Fonseca 1935 e lista das espécies do gênero *Ixodes* que ocorrem no Brasil *(Acari Ixodidae). Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **50** : 727, 1952.

BOSHELL (Jorge) y KERR (J. A.). — Veintecinco especies nuevas de trombidiideos de Colombia. *Rev. Acad. Colomb. Cienc. Exact., Fisico-Quimicas y Natur.* **5** : 110, 942.

Brennan (J. M.). — Revival of *Crostiscus* Ewing, 1944 and descriptions of four new species of the genus from Peruvian rodents (Acarina : Trombiculidae). — *The Journ. Parasitol.* **43** (6) : 673, 1957.

Bregetova (N. G.). — Gamasovuie kleschi. — Edit. Acad. Sciences de l'USSR. Moscou, 1956.

Fonseca (Flavio da). — *Eulaelaps vitzthumi* sp. n. (Acarina, Laelaptidae). *Mem. Inst. Butantan,* **IX** : 33, 1935.

Fonseca (Flavio da). — Notas de Acarologia XVIII. Novos gêneros e espécies de acarianos parasitas de ratos (Acari. Lae laptidae). *Mem. Inst. Butantan* X : 17, 1935-36.

Fonseca (Flavio da). — Notas de Acarologia XIX. Gênero e espécies novas de acarianos parasitas de mamiferos. *Mem. Inst. Butantan* **X** : 25, 1936-36.

Fonseca (Flavio da). — Notas de Acarologia XXV. Os *Laelaptidae* gigantes parasitas de roedores sul-americanos. *Mem. Inst. Butantan* **XII** : 7, 1938-39.

Fonseca (Flavio da). — Notas de Acarologia XLIV. Inquérito sôrbe a fauna acarológica de *Mesostigmata* no nordeste do Brasil. *Mem. Inst. Butantan.*

Fonseca (Flavio da). — Posição do gênero *Liponyssus Kolenati* em face das espécies tropicais ; seu desdobramento em novos gêneros. *Ciencia (Mexico)* **2** (6-7) : 262, 1941.

Fonseca (Flavio da). — Notas de Acarologia XXXII. Novas espécies brasileiras do gênero *Liponyssus* Kolenati *(Acari Liponissidae). Mém. Inst. Butantan* **XV** : 103, 941.

Herrer (A.) y Morales (J.). — Observaciones en el *Ornithodorus furcosus* sobre su posible rol como vector de la febre recurrente. *Rev. de Medicina Exper. (Lima)* **XI** (1-2) : 34, 1957.

Hirschmann (W.). — Gengsystematik der Parasitiformes. Teil 1. Rumpfbehaarung und Rükenflächen. Fürth Bay, 1957.

Tauffliеb (R.) et Mouchet (J.). — Hirstionyssus du Cameroun Français. Acarina, Laelaptidae. Description de deux nouvelles espèces africaines. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* **XXX** (1-2) : 158, 1957.

Womersley (H.). — Studies in Australian Acarina Laelaptidae. I. New recordes and species of *Laelaps* and allied genera. *Parasitology,* **29** : 530, 1937.

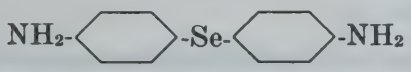
Reprinted from the
INTERNAT. J. LEPROSY
Vol. 29, No. 2, 1961

THE EFFECTS OF 4-4′-DIAMINODIPHENYL SELENIDE, DIPHENYL SULFONE, AND 4-4′-DIAMINODIPHENYL IN THE TREATMENT OF MURINE LEPROSY

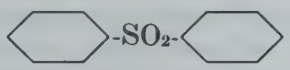
W. A. HADLER, M.D.
Department of Histology and Embryology
Faculty of Medicine, Ribeirão Preto
AND L. M. ZITI, M.D.
Laboratory of Chemotherapy, Butantan Institute
São Paulo, Brazil

In previous reports, by Hadler, Carvalho and Mauri ([2]) and Hadler and Ziti ([3]), certain compounds structurally related to 4-4′-diaminodiphenyl sulfone (DDS) were studied with respect to their activity on murine leprosy. The present report concerns an investigation of other substances, also chemically related to DDS, in a further attempt to test the structure-activity relationship. The following three substances were used:[1]

(1) 4-4′-diaminodiphenyl selenide:

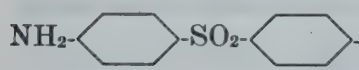


(2) diphenyl sulfone:



(3) 4-4′-diaminodiphenyl (benzidine):

The chemical analogy between these substances and DDS,



is obvious.

The activity of these compounds has been investigated on the basis of the survival rate, and of the histologic structure of the lesions, of rats inoculated with *M. leprae murium* and treated by these drugs, as compared with inoculated but untreated control animals. The effects have also been compared with the known effects of treatment with DDS reported by Mauri, Hadler and Carvalho ([4]) in animals inoculated and kept under the same conditions.

[1] These substances were prepared by the Laboratory of Chemotherapy of the Instituto Butantan, São Paulo, Brazil.

MATERIAL AND METHODS

Wistar rats of both sexes, weighing 120-140 gm., were inoculated, the same *M. leprae murium* suspension being used for all. A dose of approximately 5.5 mgm. of bacilli was injected intraperitoneally into each animal. The treatment was started 7 days after the inoculation, and was continued until the animals died or were killed. All of the substances were administered orally, added to the food.

The numbers of rats used in each treatment, the dosages used, and the length of treatment with each drug, together with the results as expressed in means of survival and coefficient of regression, are indicated in Table 1. The dosages were chosen on the basis of preliminary studies of toxicity; high but apparently not toxic doses were used. The weight of each animal was taken every 10 days throughout the experiment, as a means of disclosing any toxic effects of the drugs. The toxic effects were also evaluated in uninoculated animals which had received the same drugs in the same dosages.

Most of the treated animals were retained until they died as a consequence of murine leprosy; these animals were used in determining the survival time. Other animals were killed periodically, providing material for the pathologic study of the disease; pieces of different organs were taken, fixed in a 10 per cent formalin solution, and paraffin sections were stained by the hematoxylin-eosin and the Ziehl-Neelsen methods.

The survival time was statistically estimated on the basis of the survival mean and of the regression of the number of dead animals in time, both calculated for each treatment and for the control group. The analysis of variance was used to test the significance of the differences among the means.

RESULTS

Based on the analysis of variance of the survival means, the results shown in Table 1 indicate that only the animals treated with DDS showed a longer survival time when compared with animals of the control group which received no drug. Treatment with 4-4′-diaminodiphenyl selenide, or with diphenyl sulfone, does not produce any modification as far as the survival is concerned. The benzidine treatment, on the other hand, exerts some accelerative effect on the evolutive rate of the infection, since in the rats so treated the survival time was significantly shorter.

The pathologic studies carried out during the experiment show that only DDS treatment modifies the normal evolution and the microscopic aspect of the leprous lesions. Only in this instance were regres-

TABLE 1.—*Numbers of animals, doses of drugs, and length of treatment, and means of survival and coefficients of regression.*

Drug	Number of animals	Doses (mgm/day)	Length of treatment (days)	Mean of survival (days)	Coefficient of regression
4-4′-diaminodiphenyl selenide	20	6.5	238	160.8	—0.090
Diphenyl sulfone	20	30.9	204	151.7	—0.239
Benzidine	50	1.1	185	69.8	—0.420
DDS	20	40.0	802	427.4	—0.015
Control	20	—	277	187.3	—0.166

sive lesions seen. In the rats treated with 4-4'-diaminodiphenyl selenide, diphenyl sulfone and benzidine the lesions did not present any structural alteration, as compared with those of the control animals. These results indicate that these substances are not effective in producing involutive alterations of the lesions.

However, with respect to the appearance and the development of the lesions, the animals treated with benzidine differ from those of the control. In the benzidine-treated group the degree of development and the evolutive rate of the lesions were both increased. Rats inoculated with *M. leprae murium* and treated with benzidine show lesions, at the 110th-120th day after inoculation, which are comparable to those of the control animals on the 6th-7th month after inoculation, as far as the degree of development is concerned. This fact suggests that benzidine exerts an accelerating effect upon the evolutive rate of murine leprosy.

Benzidine and 4-4'-diaminodiphenyl selenide, in the doses used, showed a slight toxic effect as evidenced by the weight patterns of the animals which received them. However, the results obtained in a group of 20 rats treated with benzidine but not inoculated, indicate that benzidine alone decreases the survival of the animals.

DISCUSSION

The present investigation demonstrates that certain changes made in the DDS molecule, such as the replacement of the $-SO_2-$ group by selenium, or the removal of the SO_2 or of the NH_2 groups, abolishes its activity on murine leprosy. These results are in agreement with those previously reported ([2, 3]), according to which DDS lost its antileprosy activity when the SO_2 group was replaced by -SO-, -S-, -CO- and -NH- groups.

On the other hand, the present work shows a peculiar effect of benzidine, this substance accelerating the evolutive rate of murine leprosy. Benzidine exerts some toxic effects in the dose used, acting on the weight pattern and especially on the survival rate of the animals. These toxic effects, however, cannot account for the increased development of the leprous lesions in the benzidine-treated animals; but that is regarded as the result of an aggravative effect of this drug. This statement is in agreement with the higher degree of development of the leprous lesions in benzidine-treated rats which had died early.

The results indicate that the organic selenium compound employed is not effective against murine leprosy. This is in disagreement with the conclusion of Berny and Chabaud ([1]) concerning rats inoculated with *M. leprae murium* and treated with organic selenium compounds, since they reported a decrease in the evolutive rate of the disease. However, the method employed in their experiment does not allow the correct evaluation of the effect of drugs on murine leprosy.

SUMMARY

In an attempt to study the activity of certain compounds structurally related to DDS on murine leprosy, the eventual effect of 4-4′-diaminodiphenyl selenide, diphenyl sulfone and 4-4′-diaminodiphenyl was investigated in rats inoculated peritoneally with *M. leprae murium*. The results were based on the survival rates and the histologic structure of the lesions of treated animals as compared with those which received no treatment.

4-4′-diaminodiphenyl selenide and diphenyl sulfone did not exhibit any alterations, either on the survival rate or on the structural aspects of the lesions. They did not show any therapeutic effect.

4-4′-diaminodiphenyl (benzidine) is also ineffective. On the other hand, it decreases the survival time of the animals, by increasing the evolutive rate of the lesions. This effect seems to be independent of the toxic action of this drug.

RESUMEN

A fin de estudiar la actividad de compuestos estructuralmente relacionados con el DDS, en la lepra murina, se investigó el efecto eventual de 4-4′-diaminodifenilselenuro, de la difenilsulfona e del 4,4′-diaminodifenila (bencidina) en ratones "Wistar" inoculados con *M. leprae murium*. Los resultados se basaron en las curvas de supervivencia y en la estructura de las lesiones leprosas.

Fué demostrado que el 4,4′-diaminodifenilselenuro y la difenilsulfona no producen modificaciones en la supervivencia ni en la estructura de las lesiones leprosas, en comparación con animales testigos no tratados. El 4,4′-diaminodifenila tampoco presenta efecto terapéutico, notándose, incluso, una reducción del tiempo de supervivencia de los animales tratados y una evolución más rápida de las lesiones leprosas. Este efecto parece ser independiente de la acción tóxica de la droga.

RESUMÉ

Etudiant l'activité dans la lèpre murine de certains composés dotés d'une structure voisine de la D.D.S., les auteurs ont recherché l'action du 4-4′-diamino diphenyl seleniure, de la diphenyl sulfone et du 4-4′-diamino diphenyl chez des rats inoculés péritonéalement par *M. leprae murium*. Les résultats ont été établis d'après le taux de survie et la structure histologique des lésions chez les animaux traités et chez ceux qui n'étaient pas traités.

Le 4-4′-diamino diphenyl seleniure et la diphenyl sulfone n'ont entrainé aucune modification du taux de survie ni de la structure des lésions. Ils n'ont témoigné d'aucune activité thérapeutique.

La 4-4′-diamino diphenyl (benzidine) est également dépourvue d'action. Par contre, ce produit, en accélérant le développement des lésions, réduit le temps de survie des animaux. Cette action semble indépendante de l'effet toxique du produit.

REFERENCES

1. Berny, P. and Chabaud, A. Essais de traitement de la lepre murine. Bull. Soc. Path. exot. **32** (1939) 316-322.
2. Hadler, W. A., Carvalho, C. M. and Mauri, A. C. Quimioterapia da lepra. III. Ação de compostos estruturalmente relacionados ao 4,4'-diaminodifenil sulfona na lepra murina (sulfóxido, sulfeto, benzofenona e amina). Rev. brasileira Leprol. **20** (1952) 116-131.
3. Hadler, W. A. and Ziti, L. M. Chemotherapie der Lepra; experimentelle Untersuchungen über die Wirksamkeit von drei strukturmässig dem 4,4-Diaminodiphenylsulfon verwandten Verbindungen und einem Derivat desselben. Arztl.-Forschung **6** (1956) 534-536.
4. Mauri, A. C., Hadler, W. A. and Carvalho, C. M. Quimioterapia da lepra. I. Ação de 4,4'-diamino-difenil-sulfona na lepra murina. Rev. brasileira Leprol. **19** (1951) 85-106 (Portuguese); 106-116 (English).

Reprinted from the
INTERNAT. J. LEPROSY
Vol. 29, No. 2, 1961

EFFECT OF BCG VACCINATION UPON THE EVOLUTIVE RATE OF MURINE LEPROSY

W. A. HADLER, M.D.

Department of Histology and Embryology
Faculty of Medicine, Ribeirão Preto

AND L. M. ZITI, M.D.

Laboratory of Chemotherapy, Butantan Institute
São Paulo, Brazil

The reported results concerning the influence of BCG vaccination on the evolutive rate of experimental murine leprosy are in disagreement. Certain reports, by Valtis and Markianos [12], Azulay [1, 2], Kawaguchi [10], and Hanks and Fernandez [9], suggest slower development of the disease when rats previously vaccinated with BCG were afterwards inoculated with *M. leprae murium*. Such an effect of BCG would indicate a partial inhibition of the evolution of the leprous lesions and a lesser degree of dissemination of the bacillus [1, 2, 10]. Both effects would probably be correlated with the development of some degree of resistance.

On the other hand, reports by Muir and Henderson [11] and by Hadler and Ziti [4] showed that previous vaccination with BCG does not produce any alteration of the development of the disease or of the histologic structure of the murine leprosy lesions. They suggest, on the contrary, that BCG vaccination is not effective in modifying the evolutive rate of murine leprosy.

The present paper results from an attempt to investigate this matter.

MATERIAL AND METHODS

Wistar rats of both sexes, weighing 85-90 gm. at the beginning of the experiment, received 20 mgm. of fresh BCG as specified below:

(1) 30 animals injected intramuscularly;

(2) 30 animals injected intraperitoneally;

(3) 30 animals given BCG orally, by means of a stomach tube;

(4) 30 untreated animals as controls.

Thirty days after the BCG vaccination the animals of all groups were inoculated intraperitoneally with 0.5 cc. of a suspension containing approximately 5.3 mgm. of *M. leprae murium*.

The evolution of the disease was studied in the four groups, on the basis of the mean survival times of the animals and the pathologic aspects of the lesions. The survival time for each group was determined with reference to 20 animals; the mean of survival, and the regression of the number of living animals in time were calculated. The differences among the means of survival in the 4 groups were statistically analyzed (analysis of variance).

The other 10 animals of each group were killed at intervals of 30 or 60 days, providing material for the pathologic study of the leprous lesions. Besides the macroscopic

examination, pieces of liver, spleen, omentum, lymph nodes and lungs were fixed in 10 per cent formalin, and paraffin sections were stained by the hematoxylin-eosin and the Ziehl-Neelsen methods.

RESULTS

Table 1 shows the means of the survival times and the coefficient of regression of the number of living animals on time, for the four experimental groups. Table 2 indicates the results of the analysis of variance concerning the means of the survival times.

TABLE 1.—*Means of survival and coefficients of regression of the survival on time, in the four experimental groups.*

Mode of administration of BCG	Mean of survival (days)	Coefficient of regression of survival on time
Intramuscular	255.9	—0.04244
Intraperitoneal	282.2	—0.03954
Oral	215.7	—0.11204
Controls	241.8	—0.06805

TABLE 2.—*Analysis of variance of the survival means of the four experimental groups.*

Source of variation	d. f.	S sq	m. s. q.	F
Treatments	3	125.657	41.886	2.71 N. S.
Error	76	1.176.345	15.478	
Total	79	1.302.002		

The results indicate that BCG, under the conditions of the experiment, is ineffective in modifying the evolutive rate of murine leprosy.

The means of the survival times of the animals previously vaccinated with BCG, by the routes used, do not differ significantly from that of the unvaccinated control rats, when the same dose of *M. leprae murium* is inoculated intraperitoneally.

The development and evolution of the lesions, and their histologic structure, observed throughout the experiment, did not indicate any difference between the animals previously vaccinated with BCG and the unvaccinated controls.

DISCUSSION

In previous work ([7]) we have shown, on the basis of the survival times of rats inoculated intraperitoneally with *M. leprae murium*, that there exists an intimate correlation between the evolutive rate of the disease and the dose of bacilli used ([7]).

On the other hand, eventual influences on the evolutive rate of murine leprosy can be easily investigated with the aid of the mean of survival of treated animal groups, compared with untreated ones taken as control. This method has proved to be entirely suitable for testing the antileprosy activity of drugs ([6]). In such a way the eventual

influence of BCG vaccination on the evolutive rate of murine leprosy can be estimated.

As shown by the results obtained, BCG vaccination does not modify either the survival time or the structure of the lesions of rats inoculated with approximately 5.3 mgm. of the *M. leprae murium* bacillus. This is in agreement with a previous report by Hadler and Ziti ([4]), in which the results concerned animals inoculated with a small dose of bacilli. These results demonstrate the ineffectiveness of BCG either in modifying the evolutive rate of rat leprosy lesions, or in altering the behavior of the inflammatory macrophage of the normal rat ([5]). Under such experimental conditions, however, information on the evolutive rate of murine leprosy could not be obtained. The dose of mycobacteria used in the present experiment provides such information.

Vaccination of hamsters with dead BCG increases the evolutive rate of the disease produced by the inoculation of *M. leprae murium,* by decreasing the length of the early period of the disease ([8]). In this period the unvaccinated animals show evidences suggesting some degree of resistance against the infection, as far as the tissue reaction is concerned, which is inhibited by BCG vaccination.

SUMMARY

The influence of BCG vaccination on the evolution of murine leprosy was investigated on the basis of the animal survival and the histologic structure of the lesions observed in rats inoculated intraperitoneally with approximately 5.3 mgm. of *M. leprae murium.*

The BCG vaccination, with 20 mgm. of the bacilli, was carried out by intramuscular and intraperitoneal injection and by oral administration.

Statistical analysis of the survival of treated and control animals shows that BCG vaccination is ineffective in modifying the evolutive rate of murine leprosy; nor does the histologic structure of the leprous lesions show any effect achieved by vaccination.

RESUMEN

Los autores investigaron la influencia de la vacunación por el BCG sobre la evolución de la lepra murina, basándose en la curva de supervivencia y en la estructura de las lesiones encontrades en ratones "Wistar" inoculados con aproximadamente 5,3 mgr. de *M. leprae murium* por via intraperitoneal.

La vacunación con BCG se hizo con 20 mgr. de bacilos por las siguientes vias: intramuscular, intraperitoneal y oral.

El estudio estadistico de la vacunación con BCG no modifica la evolución de la lepra murina. La observación histológica reveló que la vacunación no produce alteración de la estructura de las lesiones leprosas.

RESUMÉ

L'influence de la vaccination par le B.C.G. sur l'évolution de la lèpre murine a été étudiée d'après le temps de survie et la structure histologique des lésions, chez des rats inoculés par voie intra-péritonéale avec environ 5.3 mg de *M. leprae murium.*

La vaccination par le B.C.G., comportant l'administration de 20 mg de bacilles, a été effectuée par injection intramusculaire, par injection intra-péritonéale, et par voie buccale.

L'analyse statistique du temps de survie chez les animaux traités et chez les animaux témoins a montré que la vaccination par le B.C.G. n'est pas capable de modifier le cours de l'évolution de la lèpre murine. De même, la structure histologique des lésions de lèpre ne témoigne pas en faveur d'une action quelconque de la vaccination par le B.C.G.

REFERENCES

1. Azulay, R. D. O papel protetor do B.C.G. na lepra murina. Rev. brasileira Leprol. **21** (1953) 285-291; *also* Mem. VI Congr. Internac. Leprol., Madrid, 1953; Madrid, 1954, pp. 638-642.
2. Azulay, R. D. The protective role of BCG in murine leprosy. Internat. J. Leprosy **22** (1954) 61-64.
3. Hadler, W. A. Influencia da inoculação prévia de BCG sôbre os resultados da reação da lepromina, em cobaios. Bol. Serv. Nac. Lepra **15** (1956) 5-62.
4. Hadler, W. A. and Ziti, L. M. Efeito da vacinação pelo BCG sobre a evolução da lepra murina; observação em ratos inoculados por vía peritoneal com pequena dose de "M. lepraemurium." Rev. brasileira Leprol. **22** (1954) 124-134.
5. Hadler, W. A. and Ziti, L. M. Estudo da reação da lepromina no rato préviamente inoculado com M. lepraemurium e com M. tuberculosis (BCG). Rev. brasileira Leprol. **23** (1955) 53-75.
6. Hadler, W. A. and Ziti, L. M. Algumas observações sôbre o modo de ação do 4-4′-diaminodifenilsulfona na lepra murina. Rev. brasileira Leprol. **24** (1956) 56-68.
7. Hadler, W. A. and Ziti, L. M. Relação entre a dose de *M. lepramurium* experimentalmente inoculada e a sobrevivência de ratos tratados e não tratados pela 4-4′-diaminodifenilsulfona. Rev. brasileira Leprol. **26** (1958) 19-25.
8. Hadler, W. A. and Ziti, L. M. BCG action upon evolutive rate of the disease shown by the golden hamster (Cricetus auratus) experimentally infected with Mycobacterium lepraemurium. Rev. brasileira Leprol. **26** (1958) 11-18.
9. Hanks, J. H. and Fernandez, J. M. M. Enhancement of resistance to murine leprosy by BCG plus specific antigen. Internat. J. Leprosy **24** (1956) 65-73.
10. Kawaguchi, Y. The immunological correlation of tuberculosis to leprosy. Part I. The influence of tuberculous infection upon the onset of murine leprosy. La Lepro **24** (1955) 64-71 (in Japanese; English abstract).
11. Muir, E. and Henderson, J. M. Rat leprosy. A record of experimental work carried on at the School of Tropical Medicine and Hygiene, Calcutta, between October 1925 and August 1927. Indian J. Med. Res. **15** (1928) 807-817.
12. Valtis, J. and Markianos, J. Influence du BCG sur la lèpre murine. Compt. rend. Soc. Biol. **103** (1930) 483-485.

(*Reprinted from Nature, Vol.* 187, *No.* 4735, *pp.* 414–415, *July* 30, 1960)

Bradykinin-releasing Factor from *Bothrops jararaca* venom

It was first shown by Rocha e Silva, Beraldo and Rosenfeld[1] that the venom of the snake *Bothrops jararaca* contains a bradykinin-releasing substance. Holtz and Raudonat[2] verified that the bradykinin-releasing substance is precipitated with ammonium sulphate at the level of 60 per cent, is independent of the proteolytic activity on hæmoglobin and accompanies the coagulating activity. Hamberg and Rocha e Silva[3] observed that the bradykinin-releasing factor is heat-resistant and that the decrease of its activity in presence of prolonged heating is parallel to that of the coagulating activity and to the fall of esterase activity on L-benzoylarginine methyl ester. Recently, Contzen, Holtz and Raudonat[4] found that the bradykinin-releasing substance is dialysable and ultra-filtrable, being independent of the coagulating factor but being accompanied by the hydrolysing activity on L-benzoyl-arginine methyl ester.

In the experiments reported here we have attempted to discover if the bradykinin-releasing activity is connected to the coagulating or to the L-benzoyl-arginine amidase activity of the venom and also to purify the bradykinin-releasing substance. In a first experiment a purified enzyme obtained from the venom of *Bothrops jararaca*, the *Bothrops* protease *A* (ref. 5), which is highly active on L-benzoyl-arginine amide, and a partially purified preparation of the coagulating factor, obtained by precipitation with ammonium sulphate[6], were studied. Table 1 shows that the bradykinin-releasing factor is independent of *Bothrops* protease *A*, its activity being higher in the fraction that has the strongest coagulating activity. In fact fraction 1, which is about 18 times as active as fraction 2 in its hydrolysing activity on L-benzoyl-arginine amide, liberated less bradykinin than fraction 2. On the other hand fraction 2, which is about four times as active as fraction 1 in its coagulating activity, is about twice as active as fraction 1 in its bradykinin-liberating activity. In another experiment a more active preparation of coagulating factor obtained by ammonium sulphate precipitation followed by electrophoresis on a starch column[6] was found to be less active as a releaser of bradykinin than the crude venom used for the same preparation.

Table 1

Fraction	Coagulating specific activity†	L-Benzoyl-argine amidase specific activity†	μgm. bradykinin* released per 100 μgm. protein
1	143	1,196	40
2	609	65	70

* Standard preparation of bradykinin (3 units/mgm.).
† As described by Henriques, Fichman and Henriques (ref. 6).

Table 2

Fraction	Coagulating specific activity	μgm. bradykinin released per 100 μgm. protein
Crude venom	357	100
Coagulating	1,000	50

Table 3

Fraction	Percentage of saturation with ammonium sulphate	Amidase specific activity	μgm. bradykinin released per 100 μgm. protein
1	Crude venom	27	30
2	0·45	5	—
3	0·55	9	—
4	0·60	24	—
5	0·70	72	90
6	0·80	298	240
7	1·0	35	15

It can be seen (Table 2) that the coagulating specific activities found were 357 and 1,000 respectively for the crude venom and the purified preparation, while the crude venom liberated 100 μgm. of bradykinin and the preparation 50 μgm. of bradykinin per 100 μgm. of protein. It was therefore concluded that the bradykinin-releasing activity is independent of the *Bothrops* protease *A* and coagulating activities of the venom. This does not exclude, however, the possibility that the bradykinin-releasing substance has some amidase or esterase activity, but if so it must be certainly weaker than that of *Bothrops* protease *A*.

Table 3 shows the experiment in which attempts were made to purify the bradykinin-releasing factor. The preparation was made by heating the venom and fractionally precipitating the supernatant with ammonium sulphate as previously described for *Bothrops* protease *A* (ref. 5). All the fractions were dialysed against saline for 48 hr. and then tested for its bradykinin-releasing activity. The fraction precipitated at the level of 0·70–0·80 saturation with ammonium sulphate contained the peak of the activity, being eight times as active as the crude venom used for the preparation, that is, 100 μgm. of protein of crude venom liberated 30 μgm. of bradykinin while the

same amount of protein from the fraction liberated 240 μgm. of bradykinin. The peak of activity of the bradykinin-liberating substance coincides with the peak of activity of *Bothrops* protease *A*, but as was shown above, the two activities are independent. Also in our conditions the bradykinin-releasing factor was not dialysable as observed by Contzen, Holtz and Raudonat[4].

OLGA B. HENRIQUES
MINA FICHMAN

Laboratory of Biochemistry,
Instituto Butantan,
C.P. 65, São Paulo.

W. T. BERALDO*

Department of Physiology,
Faculdade de Medicina da U.S.P.,
São Paulo. Feb. 5.

* Present address: Faculdade de Medicina da U.M.G., Belo Horizonte, Minas Gerais

[1] Rocha e Silva, M., Beraldo, W. T., and Rosenfeld, G., *Amer. J. Physiol.*, **156**, 261 (1949).

[2] Holtz, P., and Raudonat, H. W., *Arch. Exp. Pathol. Pharmakol.*, **229**, 113 (1956).

[3] Hamberg, U., and Rocha e Silva, M., *Experientia*, **13**, 489 (1957).

[4] Contzen, C. H., Holtz, P., and Raudonat, H. W., *Naturwiss.*, **46**, 402 (1959).

[5] Henriques, O. B., Lavras, A. A. C., Fichman, M., Mandelbaum, F. R., and Henriques, S. B., *Biochem. J.*, **68**, 597 (1958).

[6] Henriques, O. B., Fichman, M., and Henriques, S. B., *Biochem. J.* (in the press).

Printed in Great Britain by Fisher, Knight & Co., Ltd., St. Albans

Reprinted from:
Biochem. J. (1960) 75, 551
Printed in Great Britain

Partial Purification and some Properties of the Blood-Clotting Factor from the Venom of *Bothrops jararaca*

By OLGA B. HENRIQUES, MINA FICHMAN and S. B. HENRIQUES
Instituto Butantan, C.P. 65, São Paulo, Brazil

(*Received* 18 *September* 1959)

The blood-clotting activity of the venom of various species of *Bothrops* snakes has been studied by various authors, some of them attributing the clotting effect to the proteolytic activity of the venom (Jánszky, 1950; Zeller, 1951; Slotta, 1953), and others (Taborda, 1940; Deutsch & Diniz, 1955; Rosenfeld, Hampe & Kelen, 1960) giving evidence that separate enzymes are concerned with the two activities. Michl (1954) and Holtz & Raudonat (1956) were able to show that in the venom of *Bothrops jararaca* the clotting activity is distinguishable from its proteolytic activity. However, Hamberg & Rocha e Silva (1956) and Henriques, Lavras & Fichman (1956) have shown that in the venom of *B. jararaca* there exist at least two proteolytic enzymes. Therefore one of them could be responsible for the clotting activity. Nevertheless, Henriques, Mandelbaum & Henriques (1959) demonstrated that the clotting activity of the venom of *Bothrops jararaca* is independent of those

two proteolytic enzymes, namely 'caseinase' (Henriques *et al.* 1956) and 'protease' (Holtz & Raudonat, 1956), and *Bothrops* protease A, which hydrolyses benzoyl-L-arginine amide but not casein (Henriques, Lavras, Fichman, Mandelbaum & Henriques, 1958). Habermann (1958), by fractional precipitation with acetone followed by paper electrophoresis, obtained from the venom of *Bothrops jararaca* a fraction that had a 'relative activity' ten times as high as that of the starting material with respect to blood-clotting activity.

In this paper is given a detailed account and extension of observations previously made by Henriques *et al.* (1959). It contains also the study of some properties of the clotting factor and the results of an attempt to isolate it.

MATERIALS AND METHODS

Clotting activity. The clotting activity was measured by adding 0·2 ml. of oxalated horse plasma (0·3 g. of potassium oxalate/100 ml. of plasma) to 0·1 ml. of the sample previously placed on a water bath at 35°; the zero time was noted and the mixture gently agitated until a firm clot was formed. The samples containing the clotting factor were diluted twice or more with 0·2 M-sodium cacodylate buffer, pH 6·5. This concentration of buffer was used to obtain pH 7·0 in the final reaction mixture of sample and plasma.

Specific clotting activity. Amounts of venom which clot blood plasma or fibrinogen at between 20 and 50 sec. show a straight-line relationship when the reciprocals of enzyme concentration are plotted against the respective clotting times. Therefore when testing a sample for its blood-clotting activity, three different concentrations of protein were used and, by graphical interpolation, the inverse of the protein concentration which would cause clotting in 30 sec. was inferred from the straight line obtained. This figure, multiplied by 30 for convenience, was taken as the specific clotting activity of the sample analysed, and proved to be accurate enough for the purposes of the present work.

Proteolytic activities. The activities of the samples towards casein and benzoyl-L-arginine amide were determined respectively by the methods of Kunitz (1946) and Schwert, Neurath, Kaufman & Snoke (1948) as previously described (Henriques *et al.* 1958).

Fractionation of the venom. The venom used for this work was collected about 1 month before starting the experiments here reported, the samples being immediately dried *in vacuo* over $CaCl_2$ at room temperature. The whole procedure of fractionation and subsequent dialysis was done at 5–10°. The venom (2 g.) was dissolved in 100 ml. of 0·05 M-sodium cacodylate buffer, pH 6·10, and centrifuged to remove the insoluble residue. The proteins of the venom were fractionally precipitated with $(NH_4)_2SO_4$. The solid salt, divided into small portions, was stirred with the venom solution to give the desired percentage saturation; the amount of $(NH_4)_2SO_4$ added was calculated from the table of Green & Hughes (1955). The precipitates were centrifuged, dissolved in a small volume of 0·05 M-sodium cacodylate buffer, pH 6·10, and dialysed in cellophan tubing against the same buffer until the diffusate was free of NH_4^+ ions.

Protein determination. Protein was estimated photometrically by the biuret method of Wolfson, Cohn, Calvary & Ichiba (1948) or in terms of its ultraviolet absorption at 280 mμ in the 1 cm. cell of a Beckman spectrophotometer.

Electrophoresis on starch columns. The procedure was the same as that described by Henriques *et al.* (1958).

Activators and inhibitors. Solutions of activators or inhibitors were always freshly prepared in water and incubated for 1 hr. at 35° with the enzyme before the addition of the oxalated plasma.

RESULTS

It was observed that the clotting activity varies considerably with the buffer employed. Fig. 1 shows the clotting activity in the presence of cacodylate, phosphate and acetate buffers. In the presence of 0·2 M-sodium cacodylate the activity increased with the pH, reaching a plateau at pH 6·5 which was maintained throughout the upper useful range of the buffer. In the presence of 0·2 M-phosphate (NaH_2PO_4–Na_2HPO_4) buffer, pH 6·2, the activity was comparable with that shown with cacodylate buffer. With the rise in pH, however, the activity fell sharply. In the presence of 0·2 M-acetate (sodium acetate–acetic acid) buffer the clotting activity was shown to be higher than in the presence of cacodylate below pH 5·6, the situation being reversed at higher pH values. Other buffers, such as citrate, 2-amino-2-hydroxymethylpropane-1:3-diol (tris)–hydrochloric acid and tris maleate were tried at the pH of maximal activity in cacodylate. In all cases the activity was lower than in the presence of cacodylate. Cacodylate buffer has the further advantage of main-

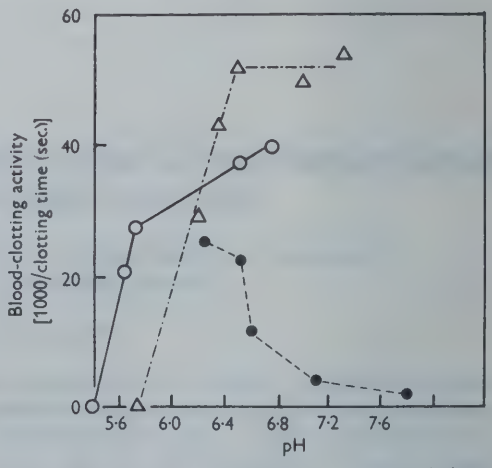


Fig. 1. Effect of pH and buffers on the blood-clotting activity of the venom of *B. jararaca*. Reaction mixture contained 0·1 ml. of 0·1% (w/v) solution of venom in the corresponding 0·2 M-buffer and 0·2 ml. of oxalated horse plasma. ○, Acetate; ●, phosphate; △, cacodylate.

taining unaltered, for at least 2 months, the clotting activities both of the solution of venom and of its fractions, when kept at 1–2° at pH 6·2.

Effect of activators and inhibitors. In these experiments the effect of the ions was tested in a crude venom solution and in a fraction purified ninefold by $(NH_4)_2SO_4$ fractionation and electrophoresis on a starch column. It can be seen from Table 1 that the ions tested affected both samples in the same way. In the presence of 2 mM-metal-ion concentration only Cu^{2+} and Hg^{2+} ions had an inhibitory effect (Table 1). Calcium had a slight activating effect, confirming a previous report by Hargreaves (1944). In the presence of 1 mM-iodoacetate, -fluoride, -sulphide, -cyanide and -azide, no effect was observed. Reduced glutathione in 50 mM concentration and ethylenediaminetetra-acetic acid (disodium salt) in 2 mM concentration strongly inhibited the clotting activity (Table 2). The inhibition by ethylenediaminetetra-acetic acid has been previously reported by Rosenfeld & Jánszky (1952).

Effect of heating. As shown in Table 3, heating the venom to 63° in 0·05 M-sodium cacodylate buffer, pH 6·2, followed by immediate cooling in an ice bath, reduces the clotting specific activity to 25 % of that of the crude venom, and heating to 87° followed by cooling in the same conditions reduces it to about 12 %. By contrast, the amidase specific activity, confirming previous observations (Hamberg & Rocha e Silva, 1956, 1957; Henriques *et al.* 1958), is more heat resistant, its activity being reduced to 75 % at 63° and to 60 % at 87°. The caseinase specific activity falls to 50 % at 63° and is completely destroyed when the venom is heated to 83°.

Separation of the clotting fraction from the venom. It can be observed from Table 4 that the highest clotting activity was found in the fraction precipitated with $(NH_4)_2SO_4$ between 0·60 and 0·65 saturation. This confirms a previous report (Henriques *et al.* 1959), in which the highest clotting activity was observed at 0·60–0·70 saturation with $(NH_4)_2SO_4$. The most active fraction obtained in this experiment had a specific clotting activity 2·4 times as great (602) as that of the crude venom (Table 4, fraction 7). Table 4 shows that some

Table 1. *Effect of metal ions on the clotting activity of the venom of* Bothrops jararaca

Venom solution was incubated for 1 hr. at 35° with test substances (final concn. 2 mM) before addition of oxalated plasma. Reaction mixture for the determination of clotting activity: 0·1 ml. of venom or fraction and metal-binding-agent mixture and 0·2 ml. of oxalated horse plasma.

Metal ion	Clotting time (sec.)	
	Crude venom	Purified fraction*
None	20·0	20·0
Mn^{2+}	19·5	19·0
Cu^{2+}	41·0	44·0
Ca^{2+}	16·0	14·5
Fe^{3+}	19·8	18·5
Ag^{+}	21·0	20·0
Pb^{2+}	19·5	19·0
Cd^{2+}	19·2	19·2
Co^{2+}	22·5	21·5
Zn^{2+}	19·5	17·5
Hg^{2+}	39·5	35·5
Mg^{2+}	19·5	17·8

* Similar to fraction 5, Table 5, obtained from venom collected in 1946; nine times purified with respect to clotting activity.

Table 2. *Effect of certain anions and metal-binding agents on the clotting activity of the venom of* Bothrops jararaca

Test substances were incubated for 1 hr. with venom before addition of oxalated plasma. Venom–test-substance mixture was incubated with plasma as described in Table 1.

Added substance	Final concn. (mM)	Clotting time (sec.)
None	—	20
Iodoacetate	1	21
Fluoride	1	20
Sulphide	1	21
Cyanide	1	21
Azide	1	21
Reduced glutathione	50	80
Ethylenediaminetetra-acetic acid (disodium salt)	2	240*

* Partially clotted.

Table 3. *Effect of heating on the clotting, benzoyl-L-arginine-amidase and caseinase specific activities of the venom*

A 2% (w/v) solution of *B. jararaca* venom in 0·05 M-sodium cacodylate buffer, pH 6·2, was heated in a boiling-water bath until the desired temperature was reached. Immediately afterwards the tube containing the sample was transferred to an ice–water bath. Specific clotting activity is expressed as 30 (mg. of protein/ml. of the sample that clots the plasma in 30 sec.). Benzoylarginine-amidase specific activity is expressed as μg. of NH_3 liberated from benzoyl-L-arginine amide/mg. of protein in the sample. Caseinase specific activity is expressed as the increase in extinction of the trichloroacetic acid filtrate at 275 mμ/mg. of protein in the sample. All the reactions were performed under standard conditions as described in the text.

Temp. reached	Specific activities		
	Clotting	Amidase	Caseinase
Room temp.	120	37	1·85
63°	30	28	0·96
87°	15	22	Nil

Table 4. *Blood-clotting activity and hydrolytic activity towards casein and benzoyl-L-arginine amide of fractions precipitated with ammonium sulphate*

Precipitation with $(NH_4)_2SO_4$ was done in 0·05 M-sodium cacodylate buffer, pH 6·10. The clotting, amidase and caseinase specific activities are expressed as in Table 3. All the reactions were performed under standard conditions as described in the text. U indicates 'undetectable'.

Fraction no.	Saturation with $(NH_4)_2SO_4$	Specific activities			Yield (%)			
		Clotting	Amidase	Caseinase	Protein	Clotting	Amidase	Caseinase
1	None	248	32	2·05	100	100	100	100
2	0·35–0·40	77·5	10·6	2·30	5·5	1·7	1·8	12·8
3	0·40–0·45	162	17·8	2·00	10·3	6·7	5·7	21
4	0·45–0·50	219	27	2·50	19·0	16·8	16·0	47
5	0·50–0·55	318	32	1·60	18·4	23·6	18·6	29
6	0·55–0·60	511	51	0·86	12·2	25·2	19·6	10·0
7	0·60–0·65	602	71	0·31	7·8	19·0	17·4	4·9
8	0·65–0·70	456	98	0·17	2·7	0·50	8·3	0·46
9	0·70–0·80	U	154	0·20	2·3	—	1·1	0·54
10	0·80–1·0	U	22·6	0·18	0·23	—	0·17	0·042

Table 5. *Comparison of the clotting, caseinase and benzoylarginine-amidase specific activities of samples obtained during purification of the clotting activity of a mixture of fractions* 6, 7 *and* 8 *of Table* 4

The specific activities are expressed as described in Table 3. All the reactions were performed under standard conditions. U indicates 'undetectable'.

Fraction no.	Step	Specific activities			Yield (%)		
		Clotting	Amidase	Caseinase	Clotting	Amidase	Caseinase
1	Mixture of fractions 6, 7 and 8 (Table 4)	501	61	0·70	100	100	100
2	Reprecipitation of fraction no. 1 at 0–0·55 saturation with $(NH_4)_2SO_4$	517	47·5	0·93	56	42·6	75·9
3	Reprecipitation of fraction no. 1 at 0·55–0·60 saturation with $(NH_4)_2SO_4$	609	65	0·36	24·7	20·8	10·5
4	Reprecipitation of fraction no. 1 at 0·60–0·65 saturation with $(NH_4)_2SO_4$	570	94	0·19	6	8·2	1·5
5	Electrophoresis peak of clotting activity (starch column) of fraction no. 3	1020	127	U	2·98	1·4	—

clotting activity was found in all fractions, no sharp separation being obtained. In order to increase the yield, fractions 6, 7 and 8 (Table 4), which had similar specific clotting activities, were mixed and fractionally reprecipitated with $(NH_4)_2SO_4$. The highest specific clotting activity was obtained at a slightly lower saturation with $(NH_4)_2SO_4$, i.e. 0·55–0·60, and the specific activity reached the value 609 (Table 5), slightly higher than that of the initial mixture (501). A second reprecipitation with $(NH_4)_2SO_4$ did not lead to further purification. When this reprecipitated fraction was submitted to electrophoresis on a starch column (cacodylate buffer, pH 6·10, I 0·05) further purification was obtained, the clotting activity reaching the value 1020, i.e. about four times as great as that of the crude venom from which it was obtained. As can be seen from Fig. 2, a clear separation of the peaks of *Bothrops*-protease A and clotting activities was obtained.

It should be noted here that the degree of purification obtained depends on the age of the venom used. When the purified clotting factor was obtained from old venoms (1946–48) by the technique described in this paper, the overall increase in specific activity was about nine- to ten-fold instead of fourfold as given here. The final specific activity of the purified material obtained either from old or new venoms was, however, about the same.

Attempts were made to purify the clotting factor with gels of aluminum hydroxide (Colowick, 1955), calcium phosphate (Keilin & Hartree, 1938), barium carbonate (Fantl & Nance, 1947) and Amberlite IRC-50 (XE-64), varying buffers and pH. Doery (1958) reported the purification of the blood-

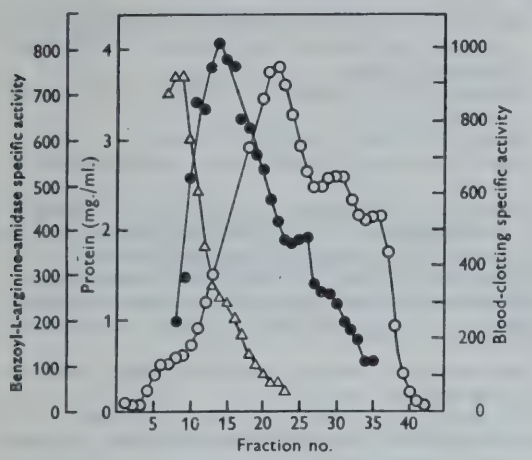


Fig. 2. Protein concentration and amidase and blood-clotting specific activities of fractions obtained by electrophoresis of 220 mg. of protein of fraction no. 3 (Table 5) on a starch column. Cacodylate buffer, pH 6·2, *I* 0·05; about 11 mA; under these conditions the proteins moved to the anode. △, Benzoyl-L-arginine-amidase specific activity; ●, blood-clotting specific activity; ○, mg. of protein/ml.

clotting factor of the venom of *Notechis scutatus scutatus* by adsorption on to barium carbonate. Treatment of the venom of *Bothrops jararaca* under the conditions specified by Doery (1958) did not lead to adsorption of the clotting enzyme on to barium carbonate. The clotting enzyme was not adsorbed by calcium phosphate but it was adsorbed by alumina-Cγ; however, the adsorption was not selective. On Amberlite IRC-50 (XE-64) the blood-clotting factor was adsorbed and eluted at pH 7·1 in cacodylate buffer when the tube test recommended by Hirs, Moore & Stein (1953) was used. However, when the ion-exchange resin was used in a column no purification was obtained.

DISCUSSION

The results presented in this paper give evidence that the blood-clotting factor differs from the two other proteolytic enzymes known to be present in the venom of *Bothrops jararaca*, namely *Bothrops* protease A and 'caseinase'. These proteolytic enzymes can already be distinguished from the blood-clotting enzyme by some of its properties. The caseinase is almost completely inhibited by Cd^{2+} ions (Henriques *et al.* 1958) whereas the clotting enzyme is not affected by the same concentration of Cd^{2+} ions. Heating the venom to 87° in cacodylate buffer (Table 3) decreased the benzoyl-arginine-amidase specific activity to about two-thirds, completely destroyed the caseinase activity and decreased the specific clotting activity to about one-tenth. The pH optimum found for the clotting enzyme was about 7·0 and the enzyme activity was found to be activated by cacodylate buffer and inhibited by tris–hydrochloric acid. The latter was found to be the best medium for caseinase and *Bothrops*-protease A activities and the pH optimum for both of these enzymes was found to be approx. 8·8 (Henriques *et al.* 1958). The three enzymes can be partially separated by ammonium sulphate precipitation (Table 4). The fractions precipitated at 0·50–0·55, 0·60–0·65 and 0·70–0·80 saturation were found respectively to contain the highest specific activity of caseinase, clotting enzyme and *Bothrops* protease A. By fractional reprecipitation of the most strongly clotting fractions a preparation was obtained which still contained a high specific activity as *Bothrops* protease A, but when it was submitted to electrophoresis on a starch column two distinguishable peaks of activity were obtained (Fig. 2), one for the blood-clotting enzyme and the other for *Bothrops* protease A. The partial separation of caseinase and the clotting enzyme by ammonium sulphate precipitation confirms previous work by Holtz & Raudonat (1956), who reported a fraction precipitated at 40 % saturation with ammonium sulphate, strongly proteolytic and with slight clotting activity and a fraction precipitated at 60 % which had strong clotting activity and was weakly proteolytic.

The clotting activity caused by *Bothrops* venom may be due to a third proteolytic enzyme. In fact evidence has been presented that Reptilase, a pharmaceutical preparation of clotting enzyme obtained from *Bothrops* venom, can split from fibrinogen a peptide (Blombäk & Vestermark, 1958) which in Dowex columns shows the same behaviour as peptide A, one of the two peptides which are liberated by thrombin from fibrinogen (Bettelheim & Bailey, 1952).

Data presented in this paper do not exclude the hypothesis proposed by Habermann (1959) that there exist in the venom three enzymes which hydrolyse N^{α}-toluene-*p*-sulphonyl-L-arginine methyl ester and, therefore, benzoylarginine amide. His hypothesis seems to be based on an electrophoresis diagram of purified blood-clotting enzyme, in which he plotted the yield of the N^{α}-toluene-*p*-sulphonyl-L-arginine methyl esterase activity against the effluent volume (Habermann, 1959; fig. 1*a*).' As judged from the diagram published by Habermann the fraction he analysed was about as polydisperse as the one included in this paper (fig. 2). Under these circumstances it is questionable whether the appearance of three peaks of yield should be accepted as evidence for the existence of three distinct N^{α}-toluene-*p*-sulphonyl-

L-arginine methyl esterases in the venom; but a final conclusion must await further purification of the blood-clotting enzyme.

SUMMARY

1. The pH optimum for the blood-clotting activity of the venom of *Bothrops jararaca* was found to be about 7·0; at this pH the enzyme was more active in cacodylate buffer, being inhibited by phosphate, 2-amino-2-hydroxymethylpropane-1:3-diol (tris)–hydrochloric acid, citrate and tris maleate. The clotting enzyme is thermolabile, its activity being reduced to about one-tenth when it is rapidly heated to 87°.

2. The venom fraction precipitated between 0·60 and 0·65 saturation with ammonium sulphate had a clotting activity about twice as high as that of the crude venom; its benzoylarginine-amidase specific activity was also about twice that of the crude venom; its caseinase specific activity was about one-sixth of that of the crude venom.

3. Fractional reprecipitation of the venom fraction precipitated between 0·60 and 0·65 saturation with ammonium sulphate followed by electrophoresis on a starch column produced a clotting fraction about four times as active as the crude venom.

4. The clotting enzyme was found to be different from the two other proteolytic enzymes found in the venom, namely 'caseinase' and *Bothrops* protease A.

Two of us (O.B.H. and M.F.) are indebted to the Brazilian Research Council for personal grants. We are also indebted to the Instituto Butantan Research Funds.

REFERENCES

Bettelheim, F. R. & Bailey, K. (1952). *Biochim. biophys. Acta*, **9**, 578.

Blombäck, B. & Vestermark, A. (1958). *Ark. Kemi*, **12**, 173.

Colowick, S. P. (1955). In *Methods in Enzymology*, vol. 1, p. 90. Ed. by Colowick, S. P. & Kaplan, N. O. New York: Academic Press Inc.

Deutsch, H. F. & Diniz, C. R. (1955). *J. biol. Chem.* **216**, 17.

Doery, H. M. (1958). *Biochem. J.* **70**, 535.

Fantl, P. & Nance, M. (1947). *Aust. J. exp. Biol. med. Sci.* **25**, 95.

Green, A. A. & Hughes, W. L. (1955). In *Methods in Enzymology*, vol. 1, p. 67. Ed. by Colowick, S. P. & Kaplan, N. O. New York: Academic Press Inc.

Habermann, E. (1958). *Arch. exp. Path. Pharmak.* **234**, 291.

Habermann, E. (1959). *Arch. exp. Path. Pharmak.* **236**, 492.

Hamberg, U. & Rocha e Silva, M. (1956). *Ciênc. e Cult.* **8**, 176.

Hamberg, U. & Rocha e Silva, M. (1957). *Arch. int. Pharmacodyn.* **110**, 222.

Hargreaves, A. B. (1944). *Rev. bras. Biol.* **4**, 367.

Henriques, O. B., Lavras, A. A. C. & Fichman, M. (1956). *Ciênc. e Cult.* **8**, 240.

Henriques, O. B., Lavras, A. A. C., Fichman, M., Mandelbaum, F. R. & Henriques, S. B. (1958). *Biochem. J.* **68**, 597.

Henriques, O. B., Mandelbaum, F. R. & Henriques, S. B. (1959). *Nature, Lond.*, **183**, 114.

Hirs, C. H. W., Moore, S. & Stein, W. H. (1953). *J. biol. Chem.* **200**, 493.

Holtz, P. & Raudonat, H. W. (1956). *Arch. exp. Path. Pharmak.* **229**, 113.

Jánszky, B. (1950). *Arch. Biochem.* **28**, 139.

Keilin, D. & Hartree, E. F. (1938). *Proc. Roy. Soc.* B, **124**, 397.

Kunitz, M. (1946). *J. gen. Physiol.* **30**, 291.

Michl, H. (1954). *Mh. Chem.* **85**, 1240.

Rosenfeld, G., Hampe, O. G. & Kelen, E. M. A. (1960). *Mem. Inst. Butantan* (in the Press).

Rosenfeld, G. & Jánszky, B. (1952). *Science*, **116**, 36.

Schwert, G. W., Neurath, H., Kaufman, S. & Snoke, J. E. (1948). *J. biol. Chem.* **172**, 221.

Slotta, K. (1953). *Experientia*, **9**, 81.

Taborda, L. C. (1940). *Mem. Inst. Butantan*, **14**, 167.

Wolfson, W. Q., Cohn, C., Calvary, E. & Ichiba, F. (1948). *Amer. J. clin. Path.* **18**, 723.

Zeller, E. A. (1951). In *The Enzymes*, vol. 1, part 2, p. 986. Ed. by Sumner, J. B. & Myrbäck, K. New York: Academic Press Inc.

Reprinted from: BOLETIN DEL MUSEO DE CIENCIAS NATURALES, : 58-62, 1960

NOTAS SOBRE LA UBICACION DE LA TERRA TYPICA DE VARIAS ESPECIES DE "SERPENTES" COLECTADAS POR M. BAUPERTHUIS EN LA "COTE FERME" Y EN LA "PROVINCE DE VENEZUELA".

Por ALPHONSE RICHARD HOGE
(Laboratorio de Ofiologia, Inst. Butantán, Sao Paulo, Brasil).

y ABDEM RAMON LANCINI V.
(Departamento de Zoología, Museo de Ciencias de Caracas).

En la Erpetologie Générale de Dumeril & Bibron & Dumeril (1854), encuéntrase la descripción o citación de varias serpientes procedentes de "Cote Ferme" y otras de la "province de Venezuela". Esta indicación, muy vaga, como lo observaron Dumeril & Bibrón, no permitió hasta el presente la localización exacta de esta región. Es interesante señalar que todos los ejemplares de estas procedencias fueron colectadas por M. Bauperthuis.

Basándonos en los datos existentes, que permiten ubicar los lugares donde Monsieur Bauperthuis vivió y, confrontando, las especies por él colectadas con las especies conocidas como ocurrentes en esas regiones, consideramos póder fijar con exactitud la región denominada "Cote Ferme" como más adelante notaremos. Sobre el colector, M. Bauperthuis, pudimos establecer que se trata de Louis Daniel Bauperthuis*, eminente

* Parece ser que el apellido correcto es Beauperthuy.

médico investigador, nacido en 1807 en la isla de Guadalupe y muerto en Bartica, Guayana Inglesa, en 1871. Uno de sus biógrafos, el Dr. Noriega Trigo (1955), escribe: "A temprana edad se trasladó a París, donde cursó todos sus estudios médicos. Además estudió Historia Natural. A poco de graduarse de médico, El Museo de Historia Natural de París le nombra "Viajero Naturalista" y le encomienda practicar estudios particularmente en las regiones circunvecinas a la "Cuenca del Orinoco" y, más adelante, afirma: "Y en una de sus incursiones Orinoco abajo, llega a la prócer ciudad de Cumaná, la que ya ha elegido para asentar sus plantas de viajero infatigable, posiblemente antes de 1841". Como puede observarse, el Dr. Beauperthuy o Bauperthuis colectaba para el Museo de París y, para el año de 1841, fecha de una de las remesas, se encontraba en Cumaná. No obstante, la actividad más destacada de Beauperthuy fue en 1853, al estallar en Cumaná una epidemia de fiebre amarilla. En esa ocasión, sospechó el ilustre médico, de un mosquito como agente transmisor de dicha dolencia, adelantándose en tres décadas a su colega cubano, Carlos J. Finlay. Beauperthuy pasó los últimos años de su vida dirigiendo una leprosería en la Guayana Inglesa, donde murió repentinamente el 3 de Septiembre de 1871.

Los ejemplares colectados y remitidos por Beaupethuy al Museo de París y descritos o mencionados por Dumeril & Bibron & Dumeril en la Erpetologie générale, son los siguientes:

Scytale neuwiedii, cotipo (=*Pseudoboa neuwiedii*) (Seleccionamos aquí como *lectotipo* de *Pseudoboa neuwiedii* Dum. & Bibr. 1854, el ejemplar colectado por Beauperthuy, procedente de la "Cote Ferme". 7 (2) :1001.)

Erythrolamprus bauperthuisii, cotipos (=*Erythrolamprus aesculapii*?*). "Cote Ferme" 1841. 7(2) :850.

Liophis reginae (=*Leimadophis reginae reginae*). "Venezuela". 7(1) :704-708.

Helicops angulatus (=*Helicops angulatus*). "Province de Venezuela". 7(1) :746-750.

Dromicus pleii, uno o más *cotipos,* (=*Dryadophis pleii*). "Province de Venezuela". 7(1) :661-663.

Oxybelis aeneus aeneus (=*Oxybelis aeneus aeneus*). "Venezuela". 7(2) :819-821.

Brachyruton plumbeum (=*Clelia clelia clelia*). "Cote Ferme". 7(2) :1004-1007.

Oxyrhopus spadiceus, tipo (=*Oxyrhopus petola petola*). "Cote Ferme". 7(2):1028-1029.

Dipsas annulata, var. B. (=*Leptodeira annulata ashmeadii*). "Cote Ferme". 7(2) :1141-1146.

Elaps frontalis, cotipo. (=*Micrurus isozonus*). "Cote Ferme". 7(2) :1223-1224.

Identificado el presunto colector, pasamos ahora a ubicar las procedencias vagas, denominadas: "Cote Ferme" y "province de Venezuela".

En su tercer viaje, Cristóbal Colón arribó el 1º de Agosto de 1498 a la aldea de Macuro (hoy Cristóbal Colón) en el Estado Sucre de Venezuela, y, era la primera vez que tocaba la ansiada Tierra Firme del Nuevo Mundo. No obstante, como afirma el historiador Baralt (1939), Colón creyó islas a la tierra firme y tierra firme a las islas descubiertas por él anteriormente. Fray Pedro de Aguado (1538), el más antiguo historiador de Venezuela, escribía sobre la Tierra Firme: "que en aquella sazón en la isla de Cubagua auia cantidad de españoles que allí rresidían del prouecho de las perlas que de la mar se sacauan y esclavos que en la tierra firme de Cumaná se tomauan, questaua muy zercana esta isla". Como podemos notar, el padre Aguado alude a Cumaná como parte de la tierra firme. Siglos más tarde, Humboldt (1826) menciona la ciudad de Cumaná como situada en tierra firme. Ahora bien, Beauperthuy, para el año de 1841 se encontraba radicado en Cumaná y los ejemplares enviados en esa fecha al Museo de Historia Natural de París tienen la indicación "Cote Ferme", que indudablemente se refiere al litoral de Cumaná o sus alrededores. En cuanto a la procedencia señalado como "province de Venezuela", bástanos con remitirnos a otro antiguo historador de Venezuela, Fray Pedro Simón (1626), quien escribía: "Llegaron al paraje donde ahora es Coro, cerca de la provincia que llaman de Venezuela, que está más de tres-

cientas leguas al Poniente de la Isla de Trinidad y Bocas de Drago". Está claro que la llamada provincia de Venezuela comprendía el actual Estado Zulia de Venezuela.

En conclusión, designamos aquí la localidad denominada "Cote Ferme" como: "Cumaná y sus alrededores" y la localidad llamada "province de Venezuela" como: 'Estado Zulia, Venezuela". Restringimos aquí la terra typica de *Scytale neuwiedii* (=*Pseudoboa neuwiedii*) *y de Erythrolamprus bauperthuisii* (=*Erythrolamprus aesculapii?*)* a la ciudad de Cumaná y sus alrededores (Estado Sucre, Venezuela). Restringimos aquí la terra typica de Oxyrhopus *spadiceus* (=*Oxyrhopus petola petola*) a Cumaná y sus alrededores, Estado Sucre, Venezuela. Restringimos también aquí la terra typica de *Dromicus pleii* (=*Dryadophis pleii*) al Estado Zulia en Venezuela.

—SUMARY—

In this article two localities are determined which still now were supposed as dubious. Lectotype of *Pseudoboa neuwiedii* is selected, and the anterior locaiization of *terra typica* of several species of "Serpentes" is restringed.

* **Presunto sinónimo de E. aesculapii aesculapii (fide Boulenger).**

—BIBLIOGRAFIA—

Aguado, Fray P. de

1538—Historia del Descubrimiento y fundación de la Gobernación y Provincia de Venezuela. Edit. Real Acad. Hist. Madrid. Tomo I. (Edic. 1950).

Baralt, R. M.

1939—Resumen de la Historia de Venezuela, Vol. I. París. (Edic. Original 1841. París).

Beauperthuy, P. D.

1891—Travaux scientifiques de Louis-Daniel Beauperthuy. Bordeaux.

Bengoa y Lecanda, J. M.

1942—Luis Daniel Beauperthuy (conferencia). Caracas.

Duméril, A. M. C., Bibron, G. et Düméril, A.

1854—Erpetologie générale ou Histoire Naturelle compléte des Reptiles, vol. 7 (1) y 7 (2).

Humboldt, A. y Bonpland, A.

1812—Voyage de A. de Humboldt et A. Bonpland. Deuxieme partie. Recueil d' Observations de Zoologie et d' Anatomie Comparée. París.

Humboldt, A. y Bonpland, A.

1816—1826—Voyage aux régions equinoxiales du Noveau Continent, fait en 1799—1804. París. Librairie grecque-latine allemande.

Iribarren Celis, L.

1958—Monagas y Beauperthuy, el héroe y el sabio. Separ. del Bol. Acad. Nac. Hist. N° 163. Caracas.

Molinari, D. L.

1941—El Nacimiento del Nuevo Mundo. 1492-1534. Historia y Cartografía. Edit. Kapelusz. Buenos Aires.

Noriega Trigo, M.

1955—Beauperthuy y la fiebre amarilla. Homenaje a su genial descubridor. Madrid.

Simón Fray, P.

1626—Noticias Historiales de las conquistas de Tierra Firme en las Indias Occidentales. I Parte. Edic. hecha sobre la cuenca de 1626. Bogotá. 1882.

Letter to the Editor
reprinted from THE LANCET, *October* 14, 1961, *pp.* 880-881

DISCREPANCIES BETWEEN BONE-MARROW AND PERIPHERAL-BLOOD CHROMOSOMAL CONSTITUTION

SIR,—Jacobs et al.[4] reported a chromosomal constitution of peripheral blood which differed from that in the bone-marrow. A constant abnormality was present in the cells of the sternal marrow, while in the peripheral blood the chromosomal picture was a mixture of two cell types.

Ford et al.,[5] Fraccaro et al.,[6] Nowakowski et al.,[7] and Sandberg et al.[8] found mosaicism in different patients with the Klinefelter or Turner syndrome.

Short-term cultures of peripheral-blood leucocytes were established by Beçak's modification[9] of the method of Hungerford et al.,[10] in cases in which the bone-marrow cell-count was constantly abnormal. In a patient with the Klinefelter syndrome (already reported [11]) the possibility of mosaicism was not dismissed [12] although the bone-marrow cells counted had 47 chromosomes. Short-term cultures of peripheral blood gave the results set out in the accompanying table and fig. 1,

4. Jacobs, P. A., Harnden, D. G., Court Brown, W. M., Goldstein. J., Close, H. G., MacGregor, T. N., Maclean, N., Strong, J. A. *Lancet*, 1960, i, 1213.
5. Ford, C. E., Jones, K. W., Polani, P. E., de Almeida, J. C., Briggs, J. H. *ibid.* 1959, i, 711.
6. Fraccaro, M., Gemzell, C. A., Lindsten, J. *Acta endocr., Copenhagen*, 1960, **34**, 496.
7. Nowakowski, H., Lenz, W., Bergman, S., Reitalu, J. *ibid.* p. 483.
8. Sandberg, A. A., Koepf, G. F., Crosswhite, L. H., Hauschka, T. S. *Amer. J. hum. Genet.* 1960, **12**, 231.
9. Beçak, W. *Rev. bras. Biol.* (in the press).
10. Hungerford, D. A., Donnelly, A. J., Nowell, P. C., Beck, S. *Amer. J. hum. Genet.* 1959, **11**, 215.
11. Leon, N., Ferrari, I., Bottura, C. *Lancet*, 1960, ii, 319.
12. Leon, N., Ferrari, I., Bottura, C. *Rev. paulist. Med.* 1960, **57**, 70.
13. Patau, K. *Lancet*, 1961, i, 933.

CHROMOSOMAL COUNTS IN THE PERIPHERAL-BLOOD LEUCOCYTES

Case	No. of cells counted	No. of cells with chromosome numbers of					
		42	43	44	45	46	47
Klinefelter syndrome	30	..	..	..	..	8	22
Gonadal dysgenesis	50	3	5	8	31	3	..

suggesting sex-chromosome complements of 47/46 chromosomes.

In a patient with gonadal dysgenesis, aged 26, exhibiting short stature, mental retardation, cubitus valgus, nævi, primary amenorrhœa with streak gonad, lack of breast development,

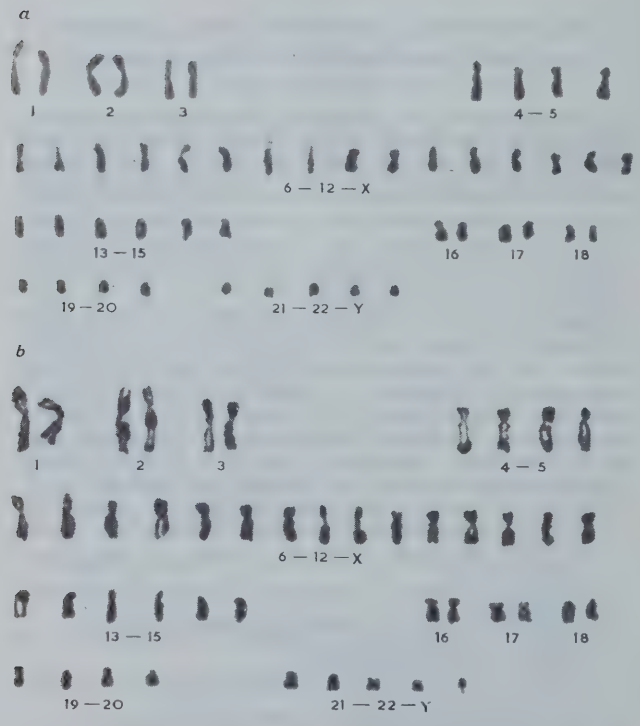


Fig. 1—(*a*) Karyotype with 47 chromosomes, numbered in accordance with Patau's classification[13]; (*b*) karyotype with 46 chromosomes.

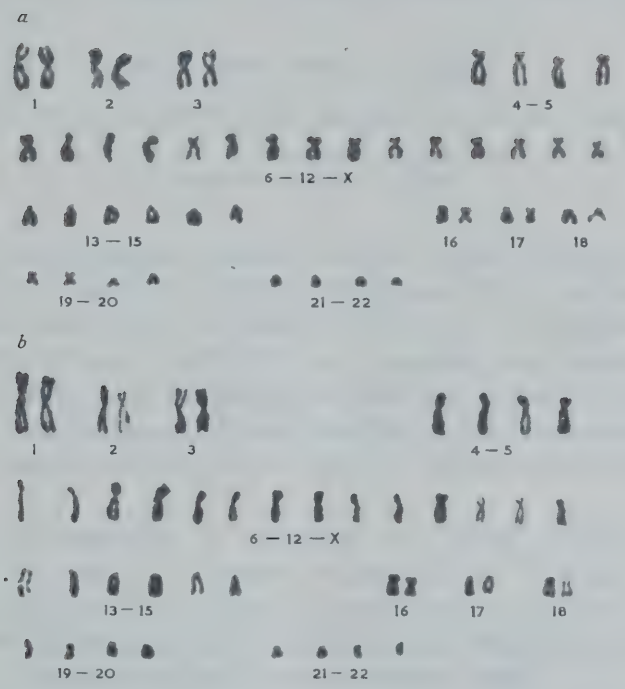


Fig. 2—(*a*) Karyotype with 45 chromosomes; (*b*) karyotype with 44 chromosomes.

and a chromatin-negative buccal smear configuration, the chromosomes in the bone-marrow were counted. A constant XO configuration was observed. The peripheral leucocyte chromosomal counts represented (see table and fig. 2) show an admixture of various cell types.

This case will be reported fully elsewhere.[14]

Department of Endocrinology, First Medical Clinic, Hospital das Clinicas, University of São Paulo, Brazil. NELSON LEON, DORINA REICHHARDT EPPS.

Genetics Laboratory, Instituto Butantan, São Paulo. MARIA LUIZA BEÇAK, WILLY BEÇAK.

14. Epps, D. R., Bottura, C., Ferrari, I. (to be published).

The Lancet Office,
7, Adam Street, Adelphi, London, W.C.2

Reprinted from: ANAIS DA ACADEMIS DE CIENCIAS, 33 : 51-54, 1961

Immunoelectrophoretic Study of the Cross Reaction Between Bovine Serum Albumin and Anti-Equine Serum Albumin

H. RANGEL AND O. G. BIER

Escola Paulista de Medicina and Butantan Institute, São Paulo, SP

(Received August 23, 1960)

The heterologous reactions between serum albumins of different species have been studied by several investigators (1-7). As far as the cross reactions of human (HSA) and bovine (BSA) serum albumins with rabbit anti-horse serum albumin (anti-ESA) are concerned, the results obtained by NAYLOR AND ADAIR (5, 6) using optimal ratios and flocculation times suggest the existence of antibodies of different specificity, since whereas some antisera reacted more rapidly with HSA than with BSA, others behaved in the opposite way.

The heterogeneity of antibodies to a single protein is strongly supported by the work of LAPRESLE, KAMINSKI AND TANNER (8-11) who, using rabbit spleen enzymes, as well as chymotrypsin, have been able to split HSA into three distinct fragments corresponding to different antibodies present in the serum of rabbits immunized with undigested HSA.

This report concerns the reactions observed with undigested and partially digested BSA in the presence of rabbit antisera against undigested BSA and ESA. The evidence provided by these experiments indicates that anti-BSA contains at least two different antibodies, one reacting with the heterologous part of the antigenic motiv of BSA, and another one corresponding to a fragment not represented in ESA.

MATERIALS AND METHODS

ANTIGENS. Crystallized BSA was obtained from *Pentex Inc.*, Kankakee, Ill. Five times crystallized ESA was prepared in our laboratory by the method of ADAIR AND ROBINSON (12, cf. p. 453). Both antigens showed only one component when tested by paper electrophoresis or by immunoelectrophoresis.

ANTISERA. Both anti-BSA and anti-ESA were produced in rabbits by intravenous hyperimmunization with alum-precipitated antigen, according to the schedule given in (12, cf. p. 543). Anti-BSA titrated 0.150 and anti-ESA 0.520 mg AbN by the method of HEIDELBERGER AND KENDALL (12, cf. p. 22, 282).

SPELEEN ENZYMES. Crude spleen extracts were prepared as described in (8). Two different preparations were employed, which showed a considerable difference in activity, as indicated below.

ENZYMATIC DIGESTION. All digestions were carried out at pH 3.5 using 1 ml of spleen extract for 200 mg of BSA in a total volume of 20 ml. Digestion was stopped by adjustment to pH 7.0 and the partially digested albumin was immediately stored at — 70°C. The degree of digestion was measured by titration with the biuret reagent of the percentage of protein precipitated by 5% trichloracetic acid. Enzyme preparation № 1 digested 30% of the albumin after 24 hours at 37°C, whereas preparation № 2 digested only 8% in 12 hours and 12% in 24 hours.

IMUNOELECTROPHORESIS. Immunoelectrophoresis were carried out as described in (13), using veronal buffer pH 8.2, $\mu = 0.05$; V = 5 volts/cm; time, 3 h; staining with amidoschwarz.

RESULTS

With spleen extract № 1 two distinct lines of specific precipitation were observed in the presence of anti-BSA: one, a, of low mobility, which

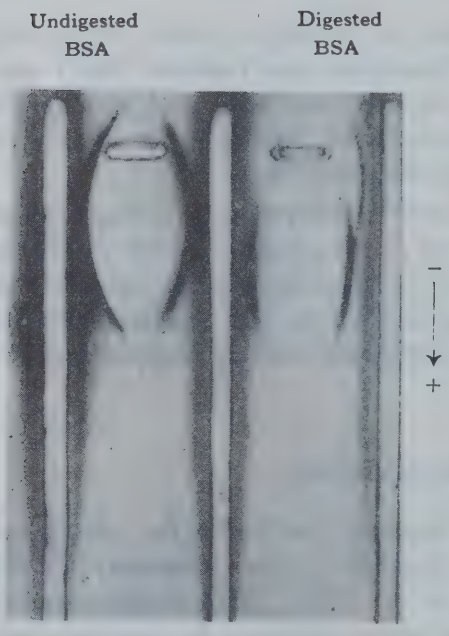


Fig. 1 — Immunoelectrophoretic pattern given by enzyme preparation № 1.

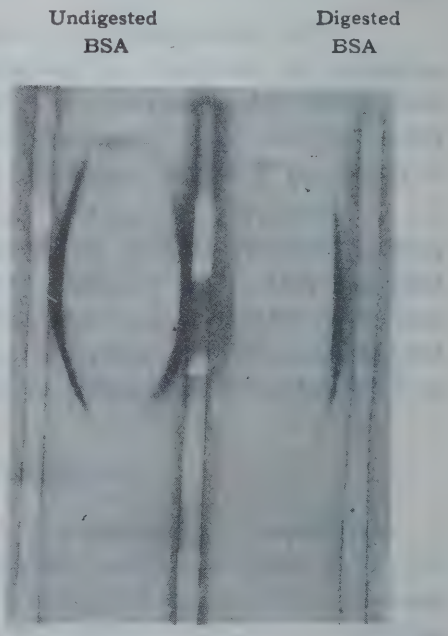


Fig. 2 — Immunoelectrophoretic pattern given by enzyme preparation № 2.

developped only with the homologous antiserum, and another, b, of considerably higher mobility, which developped with both anti-BSA and anti-ESA (fig. 1). Ensyme preparation № 2 gave an entirely different

picture. After 12 hours of digestion, when only 8% of the original albumin was no longer precipitable by trichloracetic acid, two coalescent lines were observed with the homologous antiserum and two separated but blurring lines developped in the presence of anti-ESA (fig. 2). When digestion was pursued to 12%, only one line was seen in correspondance with the homologous antiserum.

DISCUSSION

The results obtained with enzyme preparation № 1 show that the molecule of BSA may be split into two fragments, one corresponding to the homologous and one to the cross reacting part of the antigenic motiv. In preliminary experiments with ion-exchange chromatography on diethylaminoethyl cellulose, undigested BSA showed two major peaks, but these fractions were immunologically identical, since absorption with any one of them abolished the reactivity towards the other fraction. By the double diffusion method of Ouchterlony these two fractions also showed a reaction of "identity". On the contrary, partially digested BSA obtained with enzyme preparation № 1, has furnished fractions reacting with both anti-BSA and anti-ESA, as well as a fraction not represented in ESA, which reacted solely with anti-BSA.

The immunoelectrophoretic pattern given by enzyme preparation № 2 did not permit a separation of the homologous and cross reacting portions of the antigenic motiv and suggest that the latter may undergo a cleavage into non-precipitating fragments before the homologous antigenic structure is similarly destroyed. The reason for the discrepancy observed with enzyme preparations № 1 and № 2 are not apparent and may be due to the existence of a variable proportion of different enzymes in crude spleen extracts, leading to different types of digestion. Experiments with purified enzymes (pepsin, chymotrypsin, trypsin, papain) are under the way. The results consistently obtained with enzyme preparation № 1 strongly support the hypothesis that the heterologous reaction of BSA with anti-ESA is due to antibodies corresponding to a portion of the antigenic motiv and not to antibodies of poor or good fitting against the whole antigenic motiv. A similar conclusion is suggested by the recent work of WEIGLE (14. 15) in regard to other cross reacting systems.

SUMMARY

1. Data are presented concerning the immunoelectrophoretic patterns given by undigested and partially digested bovine serum albumin in the presence of rabbit antisera against undigested bovine and equine serum albumins.

2. The results suggest the existence of antibodies of different specificity corresponding to the homologous and heterologous portions of the antigenic motiv.

BIBLIOGRAPHY

1. ADAIR, M. E. AND HAMILTON, J., (1939), *J. Hyg.*, **39**, 170.
2. OUDIN, J., (1949), Doctoral thesis, Univ. of Paris, p. 979.
3. MELCHER, L. R., MASOUREDIS, S. P. AND REED, R., (1953), *J. Immunol.*, **70**, 125.
4. MEURER, P. H. AND WEIGLE, W., (1954), *J. Immunol.*, **71**, 119.
5. NAYLOR, G. R. E. AND ADAIR, M. E., (1957), *J. Immunol.*, **78**, 185.
6. NAYLOR, G. R. E. AND ADAIR, M. E., (1957), *J. Immunol.*, **78**, 130.
7. KAMINSKI, M., (1957), *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **39**, Suppl. I, 85.
8. LAPRESLE, C., (1955), *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **37**, 969.
9. LAPRESLE, C., (1955), *Ann. Inst. Pasteur*, **89**, 654.
10. LAPRESLE, C., KAMINSKI, M. AND TANNER, C. E., (1959), *J. Immunol.*, **82**, 94.
11. KAMINSKI, M. AND TANNER, C. E., (1959), *Biochimica et Biophysica Acta*, **33**, 10.
12. KABAT, E. AND MAYER, M. M., (1948), *Experimental Immunochemistry*, 1st. Ed., Ch. C. Thomas, Springfield, 111.
13. COURCON, J. AND URIEL, J., (1958), *Ann. Biol. Clinique*, N.º 3-4.
14. WEIGLE, W. O., (1960), *Fed. Proc.*, **19**, 205.
15. WEIGLE, W. O., *Personal communication*.

Reprinted from: Veronesi, R.-"Doenças infecciosas e parasitárias", Livraria Luso-Espanhola e Brasileira Ltda., S. Paulo, 1960, 2ª vol., pp. 1269-1289

ACIDENTES POR ANIMAIS PEÇONHENTOS. SERPENTES, ARANHAS E ESCORPIÕES

Gastão Rosenfeld

DEFINIÇÃO

Os envenenamentos por animais podem ser passivos ou ativos. Os passivos são os ocasionados pela sua ingestão, e há numerosas espécies de moluscos marinhos que já provocaram mortes dessa maneira. Os ativos são causados por picadas ou mordeduras de animais peçonhentos. Êstes se distinguem dos venenosos por possuírem glândulas secretoras e aparelho inoculador de veneno.

Apesar da existência, em todo o mundo, de elevado número de animais peçonhentos e da constatação de acidentes, o que desde os tempos mais remotos tem chamado a atenção de médicos e naturalistas, é curioso seja a literatura médica extraordinàriamente pobre de observações clínicas de bom padrão capazes de esclarecer ou orientar melhor os conhecimentos dêsse setor da medicina. Os progressos da terapêutica dependerão muito de melhor observação clínica e de terapêutica experimental mais sistemática do que tem sido feita até agora.

DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA

Há numerosos animais peçonhentos em todos os continentes e mares, pertencentes a grupos afastados do reino animal, porém, dos mais importantes pela freqüência e conseqüência dos acidentes são as serpentes, escorpiões e aranhas. Se bem que sejam mais abundantes nos climas quentes, existem também nos climas temperados e mesmo frios. Serpentes peçonhentas existem entre nós até em altitudes de 1.700 metros em clima bastante frio, como em Campos do Jordão, no Estado de São Paulo. Há lugares porém onde não foi constatada a existência de serpentes venenosas como na Islândia, na Nova Zelândia, nas Ilhas Hawaí etc.

CLASSIFICAÇÃO

Sob o ponto de vista médico, tem grande importância a classificação das serpentes pela posição das prêsas, pois que da sua posição ou tipo depende a facilidade menor ou maior da inoculação de veneno.

1) *Áglifa* — os dentes do maxilar superior são destituídos de sulco ou canal. Não há prêsas para inoculação de veneno. As serpentes brasileiras não peçonhentas estão nesse grupo. Apresentam êsses caracteres gêneros das famílias Colubridae, Boidae e outras;

2) *Opistóglifa* — os dentes do maxilar superior são mais ou menos iguais; os posteriores são diferenciados em um ou mais pares de prêsas sulcadas longitudinalmente. São semivenenosas, porém, em virtude da situação profunda em que as suas prêsas se

CLASSIFICAÇÃO DAS SERPENTES DA AMÉRICA DO SUL PELA POSIÇÃO DAS PRESAS.

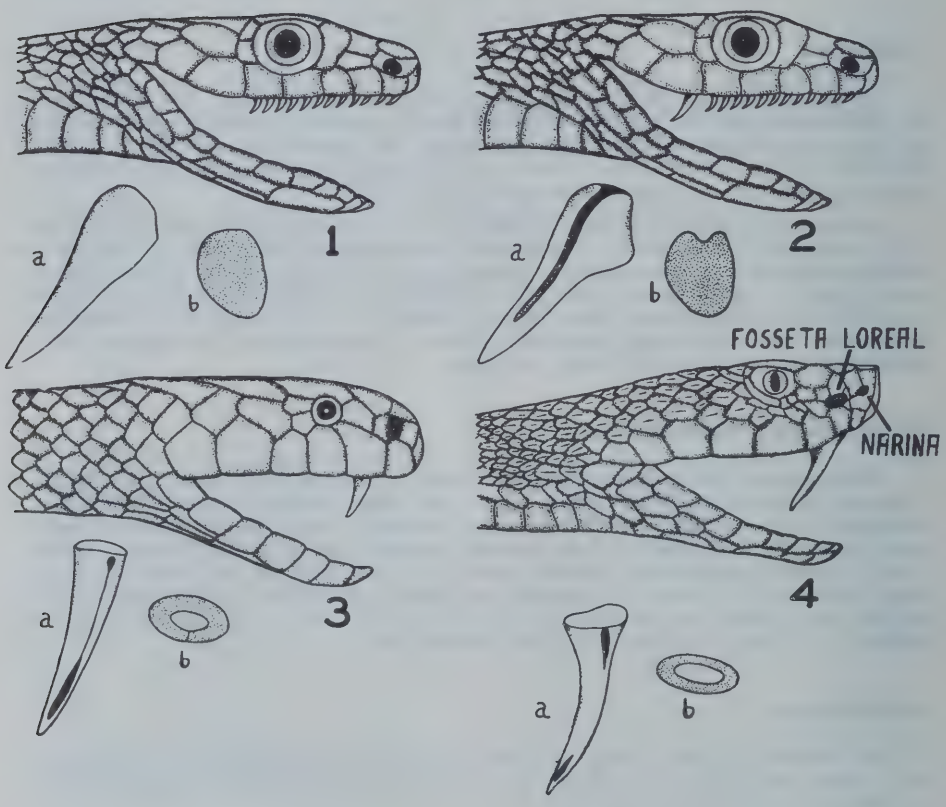


FIG. 1 — Desenho esquemático da cabeça, das presas (a) e transversal das mesmas (b). 1 Áglifa, 2 Opistóglifa, 3 Proteróglifa, 4 Solenóglifa.

NÚMERO DE GÊNEROS DE SERPENTES PEÇONHENTAS EM DIVERSOS CONTINENTES

Família	*Subfamília*	*Brasil*	*América do Sul*	*América Central*	*América do Norte*	*Europa*	*Ásia*	*Austrália e Índias Orientais*	*África*
Viperidae	Viperinae	—	—	—	—	1	8	—	6
	Crotalinae	3	3	4	3	1	3	—	—
Elapidae	Elapinae	2	2	1	2	—	7	23	9
	Dendrohaspinae	—	—	—	—	—	—	—	1
Hydrophidae	Hydrophinae	—	1	1	1	—	11	9	—
	Laticaudinae	—	—	—	—	—	3	3	—
Colubridae	Colubrinae	—	—	—	—	—	—	—	1
T o t a l		5	6	6	6	2	32	35	17

SERPENTES VENENOSAS DO BRASIL
ESPÉCIES CAUSADORAS DE ACIDENTES MAIS FREQÜENTES

ELAPIDAE

Subfamília	*Gênero*	*Espécie*	*Nome vulgar*	*Região*
Elapinae 14 espécies	Micrurus 12 espécies	M. corallinus M. frontalis M. lemniscatus	Cobra coral venenosa	Costa Centro e Sul Brasil Sul Centro e Norte
	Leptomicrurus 2 espécies		Cobra coral venenosa	

VIPERIDAE

Subfamília	*Gênero*	*Espécie*	*Nome vulgar*	*Região*
	Crotalus 1 espécie	C. durissus terrificus	cascavel	Brasil - Na Amazônia sòmente em alguns lugares
	Lachesis 1 espécie	L. muta muta	surucucu - s. pico de jaca	Brasil Norte - Centro nas matas
Crotalinae 19 espécies	Bothrops 17 espécies	B. jararaca	jararaca, jararaca rabo branco (filhote)	Brasil - Centro e Sul
		B. jararacussu	jararacussu	Brasil Sul
		B. alternatus	urutu, u. cruzeiro, cotiara rabo de porco	Brasil Sul
		B. atrox	caissaca, jararaca	Brasil
		B. neuwidii	jararaca pintada, jararaca rabo branco	Brasil
		B. cotiara	cotiara, jararaca preta	Brasil Sul
		B. bilineata	surucucu de patioba	Brasil Norte
		B. insularis	jararaca ilhoa	Ilha Queimada Grande - Litoral São Paulo

ARANHAS VENENOSAS DO BRASIL
ESPÉCIES CAUSADORAS DE ACIDENTES MAIS FREQUENTES

Família	*Género*	*Espécie*	*Região*
Avicularidae ou Theraphosidae	Acanthoscuria 1 espécie	A. sternalis	Brasil
Actinopodidae (caranguejeiras)	Actinopus 1 espécie	A. crassipes	Brasil
Sicariidae	Loxosceles 8 espécies	L. laeta L. rufipes L. surrata	Brasil Norte — Centro Brasil
Theridiidae	Latrodectus 3 espécies	L. curacariensis L. geometricus L. mactans	Brasil Brasil Brasil
Argiopidae	Araneus 2 espécies	A. audax A. nauticus	Brasil Brasil
	Ariadne 1 espécie	A. sp.	Sul
Ctenidae	Ctenus 10 espécies	C. concolor C. medius C. ornatus C. vertebratus	Brasil Sul Sul Sul
	Cupiennius 1 espécie	C. exterritorialis	Brasil
	Phoneutria 4 espécies	P. fera P. ochracea	Sul Brasil
	Trechalea 1 espécie	T. keyserlingi	Sul
	Olios 1 espécie	O. plumipes	Sul
Lycosidae	Lycosa 14 espécies	L. erythrognata L. nychthemera L. poliostoma	Sul Sul Sul

ESCORPIÕES DO BRASIL
ESPÉCIES CAUSADORAS DE ACIDENTES MAIS FREQÜENTES*

Família	*Subfamília*	*Gênero*	*Espécie*	*Região*
Buthidae	Tityinae 1 gênero	Tityius 60 espécies	T. serrulatus T. bahiensis T. cambridgei T. trivittatus	Sul Centro - Sul Amazônia - Norte Sul
	Centurinae 2 gêneros	Rhopalurus 40 espécies		Nordeste
Bothriuridae	— 3 gêneros	Bothriurus 30 espécies	B. bonariensis B. magalhaensis	Sul Centro - Sul
Chactidae	Chactinae 2 gêneros	Teuthrauster 3 espécies	T. brasiliensis	Central

* Há cêrca de 150 espécies no total.

encontram, só em raras ocasiões determinam acidentes, aliás de pouca importância. Pertencem a êsse grupo gêneros da família Colubridae;

3) *Proteróglifa*, cujas prêsas anteriores são sulcadas longitudinalmente, formando um canal interno, o que demonstra o grau de evolução do aparelho inoculador do veneno. A êsse grupo pertencem as famílias Elapidae e Hydrophidae;

4) *Solenóglifas* — Nestas, há um par de grandes prêsas anteriores canaliculadas. A protração possível pela articulação dessas prêsas inoculadoras de veneno, é uma das características anatômicas dêsse grupo, a que pertencem as serpentes da família Viperidae. Nela estão compreendidos os gêneros Crotalus, Lachesis e Bothrops, que incluem todos os gêneros de serpentes peçonhentas mais comuns do Brasil. As da subfamília Crotalinae têm fosseta lacrimal, inexistente nas Viperinae.

FREQÜÊNCIA

É impressão geral que acidentes por animais peçonhentos são raros, porém, sòmente no Hospital Vital Brasil, do Instituto Butantã, nos anos 1954 a 1957, foram atendidos 2.132 pacientes picados por serpentes venenosas (333), não venenosas (319), aranhas (1.250) e escorpiões (319), todos êles provenientes sòmente do município de São Paulo e de três ou quatro municípios limítrofes. Segundo Swaroop e Grab (17), calcula-se que há aproximadamente 30.000 a 40.000 mortes anuais por picadas de serpentes em todo o mundo (excluindo a URSS, a China e a Europa Central), assim distribuídas: 25.000 a 35.000 nas regiões sul e sueste da Ásia; 3.000 a 4.000 na América do Sul; 300 a 500 no México e na América do Norte; 400 a 1.000 no Continente Africano; 50 na Europa Ocidental e 10 na Oceania. Para o Brasil essa mortalidade seria de cêrca de 2.000. Como a mortalidade nos casos tratados é de cêrca de 2,4% (7) no Brasil, pode-se avaliar aproximadamente em 1.250.000 a 1.665.000 acidentes por serpentes peçonhentas anualmente no mundo. Levando-se

em conta que boa parte de acidentes ocorre em regiões afastadas de centros médicos é de se supor que tôdas as estatísticas feitas até aqui fiquem muito aquém da realidade.

Serpentes — Os acidentes por serpentes ocorrem principalmente nos meses quentes de novembro a abril, sendo em número muito reduzido de maio a outubro. Quanto à hora do acidente, pràticamente fica condicionada sòmente às circunstâncias, já que a estatística demonstra acidentes em todos os horários.

No Hospital Vital Brasil, do Instituto Butantã, o maior número de acidentes registrados é devido em primeiro lugar à *B. jararaca* (84,54%), seguindo-se *Crotalus t. terrificus* (11,66%), *B. jararacussu* (2,62%), *B. alternatus* (urutu) (0,87%) e coral venenosa (0,29%).

Entre as serpentes não venenosas, as maiores causadoras de acidentes (sem gravidade) foram *Helicops modesta* (7,72%), *Phylodryas shotti* (4,54%), *Thamnodynastis strigatus* (1,81%) *Dryadrophys bifossatus bifossatus* (1,36%), *Chironius quadricarinatus* (1,36%) e corais não venenosas (1,36%), seguidas de outras de menor freqüência.

Aranhas — O maior número de acidentes ocorre nos meses frios, durante as horas quentes do dia. Como 50% dos casos são no interior das habitações, pode-se concluir que nas épocas frias as aranhas procuram os interiores para se abrigar; daí a maior freqüência de acidentes nessa época. A freqüência maior das picadas é entre 9 a 11 horas, o que compreende quase 1/3 do total e, se ampliarmos êsse período das 7 às 12 horas, abrangeremos cêrca de 54% do total dos acidentes.

Por freqüência do número de acidentes em São Paulo, devem ser assinaladas a *Phoneutria fera* (63,2%), a *Lycosa erythrognatha* (8,72%), a *Phoneutria ochracea* (2,72%) e a *Loxosceles laeta* (1,40%), seguindo-se outras espécies.

Escorpiões — Tal como para com a serpentes, o maior número de acidentes é nos meses quentes, diminuindo muito no inverno; além disso, é interessante notar que o número de acidentes, nos diferentes períodos do dia e da noite, parecem depender tão sòmente das circunstâncias e não de alguma particularidade ecológica.

A maior freqüência do número de acidentes em São Paulo deve-se ao *Titiyus bahiensis* (69,71%), seguindo-se o *T. serrulatus* (1,57%).

HÁBITOS

Serpentes — As serpentes venenosas em geral não se movimentam muito nem se locomovem ràpidamente; as não venenosas são mais rápidas, fugindo ou perseguindo com ligeireza. Atacam quando delas se aproximam ou quando são tocadas ou pisadas. As cascavéis provocam menor número de acidentes por não atacar, em geral, antes de excitadas e então fazem perceber sua presença pelo ruído do chocalho caudal. Pelo contrário, as jararacas são mais agressivas, reagem prontamente e não fazem qualquer ruído, decorrendo daí um dos fatôres da maior incidência dos acidentes botrópicos. As corais, em geral, são de menores dimensões, têm a bôca menor e prêsas não articuladas, não são tão agressivas, vivem entocadas e são mais estritamente noturnas, sendo, por isso muitíssimo raros os acidentes com estas serpentes.

Os botes de tôdas elas, extremamente rápidos porém não certeiros, são dados pela distensão brusca do têrço anterior que usualmente fica encolhido em forma sinuosa; o resto do corpo, enrodilhado ou não, fica imóvel como ponto de apôio; em conseqüência, o alcance é de cêrca de um têrço do comprimento e a altura habitualmente não passa de 30 cm, o que explica a freqüência de cêrca de 76,72% das picadas ocorrerem abaixo do têrço superior da perna. Quando dão o bote, não mordem e sim batem com a bôca aberta, ficando as prêsas, que são articuladas, perpendiculares ao maxilar e nessa posição picam injetando o veneno pelo canal que possuem.

As serpentes venenosas são mais freqüentes nos campos, em terrenos cultivados e nos cerrados, do que nas matas. Concentram-se mais nas plantações abandonadas ou pouco freqüentadadas e nos pastos. Geralmente não são arborícolas, exceção feita da *Bothrops bilinlata* (jararaca verde) e da *B. castelnaudi*, que existem no norte do

Brasil; tem também êsse hábito a *B. insularis* da ilha da Queimada Grande no litoral de São Paulo. Das cobras venenosas não arborícolas, a *B. jararaca* é a que eventualmente mais sobe nas árvores. Tôdas nadam e mesmo as espécies não aquáticas podem, ocasionalmente, ser achadas na água.

Tôdas as serpentes venenosas têm hábitos noturnos. Durante o dia, em geral, ficam em esconderijos. Êstes são, freqüentemente, buracos de tatu, ôcos de árvores, covas de raízes, montes de lenha, cupins onde penetram pelas aberturas, etc. Não procuram o interior de grutas. Em geral, fogem dos lugares batidos diretamente pelo sol, a não ser nas primeiras horas da manhã e nas últimas da tarde. Muitas vêzes são vistas em pequenas clareiras ou em travessias de picadas ensolaradas quando as margens estão sombrias. A cascavel prefere lugares mais secos ou pedregosos e as bothrops os mais úmidos. As corais preferem abrigo subterrâneo. As enchentes dos rios fazem com que as serpentes, nessas ocasiões, procurem lugares adjacentes mais elevados, aumentando sua concentração.

Mesmo depois de picar ou de se alimentarem, ainda conservam veneno suficiente para outra agressão. Não são conhecidos produtos químicos ou agentes vegetais que repilam as serpentes.

Aranhas — As aranhas peçonhentas em geral não vivem em teias e quando as fazem são irregulares e não com formas geométricas. O maior número de acidentes ocorre por se ocultarem nos calçados, nas roupas, nos móveis, na lenha, nos cachos de banana etc. As Lycosas são mais freqüentes em gramados. Picam ao serem tocadas, há algumas porém, como as Phoneutrias, que são mais agressivas.

Escorpiões — Costumam ocultar-se nos lugares sombrios e frescos, debaixo de paus, tábuas, telhas, pedras etc. Picam ao serem molestados, sendo a incidência de acidentes maior nos meses quentes, indiferentemente a qualquer hora do dia ou da noite.

VENENOS

Patogenia — De modo geral, pode-se dizer que os venenos das serpentes, das aranhas e dos escorpiões preenchem a função de facilitar a alimentação imobilizando ou matando a prêsa, muitos dêles, também desempenhando funções de suco digestivo. São secreções de glândulas especializadas ligadas a prêsas ou ferrões canaliculados inoculadores. São misturas complexas de substâncias protéicas com propriedades enzimáticas diversas, como fosfatidásica, colinoesterásica, proteolítica, hialuronidásica, etc., ativas sôbre diferentes substratos dentro de cada um dêsses grupos de atividade.

Sob o ponto de vista médico, as propriedades dos venenos podem ser definidas como: coagulantes, proteolíticas ou necrosantes, hemolíticas e neurotóxicas. Sua composição difere de família para família e de subfamília para subfamília. Varia menos de gênero para gênero e apresenta também diferenças nas proporções dos diversos componentes de acôrdo com as espécies. Casos há em que uma espécie, em algumas regiões, pode apresentar substâncias tôxicas não existentes nas outras, como se dá por exemplo, com a crotamina nas cascaveis (11).

Não foram até agora isolados os fatôres responsáveis pelas diferentes atividades dos venenos, porém há numerosos trabalhos que vêm aumentando os conhecimentos e evidenciando ao mesmo tempo a complexidade das atividades farmacológicas dos venenos.

Do veneno botrópico foi separada uma fração provàvelmente impura mas altamente coagulante (9-10), assim como uma fração proteolítica (8). A atividade coagulante, também utilizada para fins terapêuticos, é provàvelmente devida a fator diverso dos que provocam a proteólise, pois há nítida desproporção entre atividade coagulante e fibrinolítica (14). Do veneno crotálico foram separadas a crotoxina (16) e a crotamina (11).

Ligada à atividado fosfatidásica está a ação hemolítica dos venenos, que é indireta, pois não hemolisa os glóbulos isolados. O veneno, em presença da lecitina do plasma ou do sôro, produz a lisolecitina que vai agir sôbre as hemácias. Estas, ao

serem atingidas pela lisolecitina, ficam lesadas em sua constituição, e, aumentando de volume, tendem para a forma esférica diminuindo sua resistência; passam por isso a ter vida mais curta, sendo destruídas em grande número, gradualmente, num intervalo de dias, ocasionando não só anemia mas também todos os inconvenientes de uma hemólise maciça como hemoglobinemia, hemoglobinúria etc. Provàvelmente a lisolecitina provoca o mesmo gênero de lesão sôbre outras células do organismo, até agora não descrita.

Qualquer dêsses venenos pode provocar choque e colapso periférico e tôda a sintomatologia decorrente dêsses estados, quando penetra na circulação em grande quantidade. Isso é devido às diversas propriedades enzimáticas que liberam várias substâncias, como a bradicinina (12), a histamina e outras, e estas por sua vez desencadeiam fenômenos que também acarretam liberação de outras, criando verdadeiro círculo vicioso (mecanismo autofarmacológico).

As diversas frações coagulantes, proteolíticas e hemolíticas, ligam-se ràpidamente às células ou às proteínas. Uma vez lesadas estas, não há tratamento que possa recompor a célula ou a substância humoral atingida, pois as modificações produzidas são irreversíveis. Daí a necessidade de neutralizar o veneno na circulação o mais ràpidamente possível, a fim de que se possa interromper essa cadeia de fenômenos no organismo, cortando o ciclo na primeira fase pela *neutralização* do agente inicial.

O sôro antiveneno, sendo apenas um neutralizador do veneno, não poderá regenerar as hemácias, os endotélios, os vasos, os tecidos necrosados, reconstituir as proteínas decompostas nem fazer cessar as hemorragias nos diferentes tecidos em que já ocorreram. Êle sòmente poderá impedir que êsses fenômenos prossigam. A irreversibilidade das alterações sòmente não se aplica às atividades neurotóxicas dos venenos, pois as manifestações clínicas a elas atribuídas regridem totalmente com o tratamento pelo sôro e possìvelmente são devidas a ação farmacológica que não produz lesão anatômica. Lesões histopatológicas dos tecidos do sistema nervoso, provocadas por essas ações dos venenos, não são conhecidas a não ser as que possam ocorrer por hemorragias locais.

Fisiopatologia — Cada grupo de veneno tem ação mais ou menos evidente num dos setores assinalados, de acôrdo com as substâncias tôxicas que possui e as proporções existentes entre elas. Sob êsse critério, os venenos das serpentes, classificados por suas principais ações no organismo, podem ser divididos em três grandes tipos:

a) *Botrópico*, característico das espécies dos gêneros Bothrops, Vípera, Agkistrodon e Sistrurus, nêle podendo ser incluído também o gênero Lachesis;

b) *Crotálico*, característico da *Crotalus durissus terrificus;*

c) *Elapídico*, típico das serpentes das famílias Elapidae e também das serpentes marinhas da família Hydrophidae.

Veneno botrópico (coagulante e necrosante) — Tem grande poder coagulante, necrosante e é pouco hemolítico. Ao penetrar lentamente na circulação, desfibrina o sangue pela coagulação do fibrinogênio em microcoágulos e também pela destruição direta dessa proteína. Provoca assim incoagulabilidade do sangue por fibrinopenia. Se a penetração é rápida e a dose total ainda pequena, essa desfibrinação é precedida de hipercoagulabilidade que dura alguns minutos. Quando a dose inoculada é elevada e na veia, há morte rápida (dentro de minutos), devido à coagulação intravascular maciça, seguida, após a morte, de liqüefação do sangue pela posterior fibrinólise. Uma dose de 0,1 mg por kg injetada na veia provoca incoagulabilidade sem morte, já 0,4 mg por kg provocam a morte devido à coagulação maciça. Caso uma dose da intensidade da segunda seja injetada após desfibrinação pela dose inicial, não sobrevirá morte rápida pela coagulação intravascular global e sim tardia por desencadear colapso periférico. Essa é a forma usual da morte após a picada por serpentes do gênero bothrops. Como o veneno é coagulante, no ponto de inoculação provoca um coágulo que serve de barreira natural ao veneno, o qual, então, só gradualmente pode penetrar na circulação e, em conseqüência, vai desfibrinando o sangue e, se continua a penetrar, vai provocar um estado de choque que acarreta a morte. Quando a quantidade de veneno botrópico inoculada foi muito elevada, podem sobrevir hemor-

ragias externas, epistaxe, gastrorragias, melena, etc., o que ocorre mais freqüentemente nas picadas por *B. jararacussu, que* pode inocular grandes quantidades de veneno. Via de regra, porém, nos acidentes botrópicos não se notam hemorragias externas nem essa manifestação representa problema terapêutico mesmo quando o sangue está incoagulável; podem porém ocorrer pequenas hemorragias intratissulares em diferentes órgãos. Aplicação prática dos fenômenos expostos é a avaliação rápida da quantidade de veneno que penetrou na circulação; o achado de incoagulabilidade do sangue indica já haver penetrado dose igual ou superior a 0,1 mg por kg, fazendo presumir gravidade, enquanto, se não verificada essa anormalidade, se pode afirmar que a quantidade de veneno que penetrou na circulação é menor que essa dose e, portanto, o caso pode ser rotulado de benigno.

O fator coagulante e desfibrinante não parece poder ser responsável pela morte, a não ser quando penetrar diretamente na veia em dose igual ou superior à de 4 mg/kg, pois, conforme observações experimentais e clínicas, a desfibrinação não é acompanhada de sintomas clínicos graves. Êstes só aparecem proporcionalmente aos sintomas locais devido aos fatôres necrosantes.

O veneno botrópico tem ação necrosante por suas propriedades proteolíticas e destrói tecidos na região da picada. O fato de provocar coagulação o impede de circular ràpidamente; fica retido na zona atingida, agravando a necrose. A lesão necrótica, que aparece irregularmente com doses de 1,0 mg por kg por via muscular, passa a ser provocada regularmente com a dose de 1,2 mg/kg. Doses não necrosantes, mesmo sem tratamento, não provocam a morte, a não ser em raros casos, enquanto o óbito ocorre em muitos animais com a dose necrosante.

É provável portanto que a dose mortal para o homem (60 kg) por via muscular ou subcutânea seja aproximadamente a partir de 70 mg de veneno sêco e que sòmente haja êsse risco em face de sintomas locais intensos que sempre precedem a necrose.

O veneno botrópico, conquanto tenha atividade hemolítica "in vitro", nos acidentes por êle causados não demonstra grandes alterações dêsse gênero, por ser mais fraca essa sua ação em relação a outros venenos.

As serpentes que possuem veneno dêsse tipo, produzem fenômenos patológicos que variam um pouco de acôrdo com as proporções de seus componentes, porém as principais alterações que causam são na coagulação, na lise dos tecidos (necrose local) e provocam a morte devido a colapso periférico. Excepcionalmente, esta pode ser quase imediata se a picada atingir a luz de um vaso sangüíneo e então se dá pela coagulação intravascular global.

Veneno crotálico (hemolítico e neurotóxico) — O veneno de *Crotalus durissus terrificus* é pouco coagulante e proteolítico e por isso não provoca lesão local nem microcoágulos pulmonares (Exceção deve ser feita para o veneno das outras espécies de crotalus da América Central e do Norte que tem ação coagulante e necrosante acentuada, porém é menos hemolítico e neurotóxico). O envenenamento crotálico não altera o tempo de coagulação. Só há incoagulabilidade quando sobrevém choque, do qual é provàvelmente fenômeno secundário.

As principais conseqüências dêsse veneno são devidas a sua ação hemolítica. Além de provocar glomerulonefrite local, lesa, principalmente os túbulos renais provocando necrose e acarretando a síndrome do néfron inferior (1-2), idêntica às determinadas por outras causas, como transfusão por sangue incompatível ou síndrome de esmagamento. Êsse processo patológico é o que acarreta a morte tardia descrita nos casos de envenenamento crotálico. Sobrevém sòmente após um período de anúria total ou relativa, proveniente do acúmulo de substância tóxicas endógenas e da perturbação do equilíbrio iônico, características da síndrome.

As manifestações clínicas atribuídas à neurotoxina constituem-se de dor na região cervical posterior, ptose palpebral, diminuição e perda da visão, caracterizada esta inicialmente por deficiência de acomodação e como que descoordenação da visão entre os olhos; há ainda obnubilação e torpor acentuado com dificuldade de falar, não acompanhados por hipotensão nem hipotermia. Porém, não são ainda conhecidas lesões histopatológicas dos tecidos do sistema nervoso, a não ser hemorragias locais intratissulares como foi referido anteriormente.

Experimentalmente em cães, 0,2 mg/kg de veneno crotálico branco ou amarelo por via endovenosa são suficientes para provocar a morte, enquanto por via subcutânea ou intramuscular são necessárias doses a partir de 0,4 mg/kg. Conseqüentemente, pode-se supor necessários mais de 24 mg de veneno por essa via para provocar a morte do homem adulto de 60 kg.

Não há observações clínicas sôbre a eventual diferença entre os venenos amarelo e branco assim entre os que possuem ou não crotamina.

Não foi encontrado o veneno crotálico (branco ou amarelo) no líqüido cefalorraquidiano de cães inoculados. Em alguns casos humanos também foi constatada a ausência do veneno.

Veneno elapídico (neurotóxico) — Não produz lesões locais pois é pràticamente destituído de atividade coagulante e proteolítica.

O veneno é especìficamente neurotóxico, provoca inicialmente anestesia da região picada e sensação de adormecimento que progride gradativamente pelo membro atingido e, ao atingir a região da faringe, causa sensação de constrição com salivação ou expectoração espêssa difícil de ser eliminada, seguindo-se dificuldade respiratória; pode, finalmente, provocar a morte por asfixia devido à paralização do diafragma e do tórax.

As perturbações visuais são idênticas às descritas para o veneno crotálico e aparecem o mesmo torpor e a dificuldade de falar.

Veneno Aracnídico (neurotóxicos, necrosantes e hemolíticos). Certos venenos são "dermotóxicos", provocando necroses superficiais da pele (Lycosas); outros necrosantes e hemolíticos (Loxosceles), enquanto alguns são sòmente neurotóxicos (Ctenidae). Apesar de muito tóxicos, devido a pequena quantidade que as aranhas possuem (no máximo 3-5 ou 8 mg), provocam a morte excepcionalmente em indivíduos de pouco pêso ou em más condições físicas. A sintomatologia clínica é acentuada, quando existe êsse risco. Os venenos das Loxosceles e Latrodectus são os mais perigosos, seguindo-se os das Ctenidae.

Veneno Escorpiônico (neurotóxico) — Experimentalmente tem ação miótica sôbre a pupila, estimula a secreção das parótidas, propriedades essas inibidas pela atropina que não diminui entretanto a atividade tóxica mortal. É simpaticomimético e a eserina potencia a ação sôbre a contração assim como a toxicidade. A quantidade máxima de veneno pode atingir 3 mg no *T. serrulatus* e *T. bahiensis* (5).

SINTOMAS E SINAIS

CARACTERÍSTICAS DA PICADA

Serpentes — Os sinais da picada variam desde simples arranhão a marca punctiforme única ou dupla. Nem sempre há relação com a distância entre os dois sinais da picada e as dimensões da cobra, assim como também não o há entre as dimensões da serpente e a quantidade de veneno inoculado. Podem-se apresentar sem reação periférica, com um simples edema, equimoses minúsculas ou grande equimose com edema e flictenas ou ainda com cianose ascendente pelo membro no trajeto de veias.

Nos acidentes crotálicos e elapídicos, mesmo depois de decorrido algum tempo, não há relação entre os sintomas locais e a gravidade do envenenamento. Nos acidentes botrópicos, imediatamente após a picada, também não há relação, porém, depois de uma ou mais horas, a intensidade dos fenômenos locais indica a gravidade do envenenamento. A

única exceção neste último caso, é a picada por jararacas muito jovens (também chamada jararaca de rabo branco), em que não há aparecimento de sintomas locais, resumindo-se em simples equimose areolar, embora o sangue possa estar incoagulável; êsse fato é devido à ausência de fatôres necrosantes no veneno dêsse espécime, ao lado de atividade coagulante maior que nos adultos. Como a eficiência do tratamento depende essencialmente de sua especificidade em relação ao animal causador do acidente, e como nem sempre êsse é trazido para identificação, torna-se fundamental o conhecimento dêsses sintomas locais além dos outros gerais para a orientação da terapêutica. A sintomatologia permitirá quase sempre a identificação da serpente pelo tipo de veneno, no que interessa à finalidade terapêutica.

Problema diagnóstico que às vêzes aparece é saber se na realidade houve picada por serpente peçonhenta e eventualmente ausência de inoculação de veneno. A constatação de lesões locais ou de incoagulabilidade do sangue permite afirmar que se trata de acidente botrópico; a ptose palpebral e a hemoglobinúria ou hematúria, de acidente crotálico; a ptose e os sintomas de paralisia, de acidente elapídico.

Aranhas — As da família Ctenidae deixam como vestígio local da picada sòmente um sinal punctiforme ou pequena erosão epidérmica. As Lycosidae só se fazem notar a partir de 24 horas por uma flictena ou região enegrecida da pele, que se torna sêca e apergaminhada (início da necrose superficial). As Sicariidae porém produzem necrose local cercada de região equimótica mais ou menos extensa.

Escorpiões — Deixam apenas pequeno sinal punctiforme.

ACIDENTE BOTRÓPICO

Na prática, tôdas as serpentes do gênero Bothrops produzem sintomas semelhantes, variando de intensidade na razão direta da quantidade de veneno inoculado. Certas espécies como a *B. jararacussu* podem injetar grandes volumes de veneno; daí êsses acidentes poderem aparentar sintomatologia mais acentuada.

Há sempre dor local que pode ser muito intensa. Se a quantidade de veneno fôr pequena, os sintomas limitam-se a essa dor. Como gradação seguinte sobrevém equimose em volta do sinal, esta vai aumentando e aparecendo edema. Em seguida aparecem flictenas. O edema e a equimose se vão estendendo membro acima; o edema, adiante da equimose. As veias superficiais podem tornar-se visíveis como um trajeto equimótico. Em casos de jararacussu podem aparecer epistaxis gengivorragias e pequenas hemorragias nos bordos das unhas e no couro cabeludo.

Nos casos leves não aparecem vômitos, com exceção dos indivíduos emotivos. Nos casos severos o vômito pode ser incolor, bilioso e até sangüíneo, seguindo-se sudorese e lipotimia.

A pressão arterial é normal; quando diminuída, pode sobrevir choque. A temperatura no início é baixa ou normal, aparecendo febre mais tarde, quando a lesão local é extensa. O pulso em geral mantém freqüência normal e outras vêzes está acelerado.

Depois de dias pode ocorrer necrose dos tecidos na região da picada, o que pode até obrigar a amputação. A infecção local também é freqüente.

O sangue coagula aproximadamente dentro do tempo normal nos casos benignos, ficando incoagulável cêrca de 30 minutos após a picada nos casos de envenenamento mais intenso. Cêrca de 6 horas depois podem aparecer leucocitose e neutrofilia. Há no início hemoconcentração e aumento do volume das hemácias, seguindo-se anemia. Logo após a picada, a hemossedimentação diminui e pode ser nula. Tôdas as alterações são proporcionais à intensidade do envenenamento.

ACIDENTE CROTÁLICO

A dor local é pouco freqüente e quando existe não é intensa. A região fica normal ou apresenta pequeno aumento de volume com sensação de adormecimento. Aparecem posteriormente dor na região da nuca, diminuição e até perda da visão, ptose palpebral e obnubilação. Êsses sintomas são proporcionais ao grau de envenenamento. O facies é caraterístico devido à ptose palpebral.

A pressão arterial é normal ou ligeiramente aumentada, mesmo em casos fatais. Em geral a temperatura é normal, podendo haver hipo ou hipertermia. O pulso é normal, podendo ocorrer taquicardia ou bradicardia em casos mortais. A anúria é proporcional à gravidade. Pode haver vômitos, hemoglobinúria, colapso periférico e todos os sintomas de desequilíbrio iôntico que caracterizam a síndrome do néfron inferior, iguais aos da "crush syndrome" ou síndrome de esmagamento, nos casos em que a intensidade do envenenamento provoca anúria. A infecção local é excepcional.

O tempo de coagulação é normal. Há incoagulabilidade nos mais graves e êsse estado é encontrado algumas horas depois da picada, nos casos fatais. Cêrca de 6 horas depois podem aparecer leucocitose e neutrofilia. Há no início hemoconcentração e aumento do volume das hemácias, seguindo-se anemia. Logo após a picada, a hemossedimentação diminui e pode ser nula. Tôdas essas alterações são proporcionais à intensidade do envenenamento.

ACIDENTE ELAPÍDICO

O local da picada fica normal, apresentando apenas o sinal da prêsa. Há, entretanto, sensação de adormecimento da região, a qual, conforme a gravidade, continua pelo membro atingido na direção do tronco, freqüentemente acompanhada de dor axilar ou inguinal. A progressão dessa

sensação pode ser precedida de dor que parece percorrer o trajeto dos nervos. Posteriormente progridem os sintomas descritos como conseqüentes à ação do veneno elapídico. O facies é normal, assim como o pulso e a temperatura. O tempo de coagulação é normal podendo aparecer ligeira leucocitose e neutrofilia.

ACIDENTE ARACNÍDICO

Os venenos de aranhas diferem de atividade, conforme a família a que pertencem. As Lycosidae não provocam dor; quando o fazem, ela é muito leve; causam, entretanto necrose da pele (dermotóxicas) em cêrca de 30% dos casos. As Sicariidae têm as mesmas características das Lycosidae, provocando ainda lesão equimótica em volta da picada e icterícia intensa e grave que se desenvolve dias depois, com caracteres clínicos de icterícia por hepatite a vírus, nos poucos casos que foi possível observar.

As da família Ctenidae caracterizam-se por provocar dor muito intensa, sem reação no local da picada. Há porém outros sinais clínicos gerais como leve hipertensão arterial e taquicardia com hipotermia e sudorese, cuja intensidade é proporcional à dor.

Êsses fenômenos clínicos cedem com o desaparecimento da dor, quer seja êle obtido com terapêutica analgésica, quer a regressão se dê espontâneamente. Parecem meros fenômenos secundários à dor e não devidos a ação direta do veneno sôbre o sistema nervoso.

ACIDENTE ESCORPIÔNICO

O veneno provoca dor muito acentuada sem reação local. Há freqüentemente leve hipotensão arterial com pequeno aumento da mínima, taquicardia, hipotensão e sudorese. Como no caso das aranhas ctenidae, êsses sintomas têm intensidade proporcional à dor.

Clìnicamente não tem sido observada no Butantã potenciação da ação do veneno pelo emprêgo da morfina, fato também confirmado experimentalmente.

TRATAMENTO

SOROTERAPIA

Os soros antivenenos, obtidos de cavalos imunizados com determinados venenos, são fracionados para eliminar as soroalbuminas e concentrados em seu teor de globulinas, tendo taxa relativamente baixa de proteínas. Conservam-se bem na geladeira ou em lugar fresco, mantendo atividade mesmo após muitos anos. Além de 5 anos é conveniente considerar como

tendo 50% da atividade neutralizante indicada no rótulo. Quando apresentam precipitado, êste deve ser desprezado, pois é inativo; consegue-se isto não agitando a ampola e aspirando na seringa sòmente o sobrenadante mais transparente. Nas injeções subcutâneas não é necessário adotar essas precauções.

Os soros têm atividade específica dentro do gênero da serpente. Assim o anticrotálico neutraliza o veneno de cascavel, o "antibotrópico polivalente" age contra o veneno das diferentes Bothrops (jararaca, urutu, jararacussu, etc), o "antielapídico" neutraliza o veneno das corais e o "antilaquésico", o da surucucu. O "antiofídico" neutraliza o da cascavel e das Bothrops. Deve-se sempre injetar o sôro específico para o gênero da serpente causadora do acidente, que é quase sempre possível identificar pelas informações e os dados clínicos; obtém-se assim mais eficiência no tratamento. Caso não seja encontrado prontamente o sôro indicado, deve-se injetar o que se dispuser, pois, como há algumas frações tóxicas comuns a diversas serpentes, pode-se conseguir resultado parcial precário (neutralização cruzada).

Segundo a Farmacopéia Brasileira, as concentrações mínimas de antivenenos nos soros antiofídicos são as seguintes por ampola de 10 ml:

Sôro anticrotálico	4,0 mg
" antibotrópico	10,0 mg
" antiofídico	3,0 mg de crotálico 10,0 mg de botrópico
" antielapídico	30 d.l.m. de veneno elapídico
" antilaquésico	8 mg de veneno laquésico.

Essas concentrações são fracas e aquém das necessidades reais, devido à quantidade de veneno que pode ser inoculada. Os casos curados com uma ou duas ampolas de sôro são aquêles em que a dose de veneno injetada não produziria a morte.

Os dados abaixo permitem ajuizar da quantidade de veneno que pode ser injetada, considerando-se como dose mortal presumível para um adulto, 20 mg de veneno crotálico e 70 mg de veneno botrópico.

Quantidade de veneno sêco obtido em uma só extração.

N.º de Serpentes %

Espécie	*Menos da dose mortal*	*Mais da dose mortal*	*Mais de 100 mg*
Crotalus durissus terrificus	38	62	5,8
Bothrops jararaca	82	18	4,8

A norma a ser adotada é não levar em conta o número de ampolas e sim o de miligramas de veneno que neutraliza o sôro de que se dispõe. Assim a indicação das doses será em função da capacidade neutralizante de miligramas de veneno, usando-se o volume necessário.

Com os atuais conhecimentos e as possibilidades técnicas de preparação de soros, impõe-se a preparação de soros concentrados capazes de neutralizar de 25 a 50 mg de veneno por ampola de 10 ml, se realmente se quer diminuir ou evitar a mortalidade, especialmente nos acidentes crotálicos. Já foi tomada essa iniciativa pelo Instituto Butantã.

Conforme foi esclarecido anteriormente, os soros antivenenos neutralizam o veneno livre, evitando que possa provocar lesões, porém não curam as lesões ocorridas. Conclui-se que a soroterapia deve ser feita o mais ràpidamente possível, a fim de neutralizar o veneno já existente no sangue, e de manter na circulação quantidade de antiveneno capaz de neutralizar o veneno que gradualmente vai saindo do ponto de inoculação e penetrando na circulação. Como o sôro antiveneno mantém-se no sangue pelo menos 4 dias, no fim dos quais vai decrescendo lentamente é conveniente injetar prontamente tôda a dose necessária de uma só vez.

Quando os sintomas gerais são graves, é indício de que penetrou na circulação dose apreciável de veneno, devendo-se por isso injetar o sôro na veia a fim de neutralizá-lo imediatamente e evitar assim que vá lesar células e tecidos de diversos órgãos, lesões essas irreversíveis.

Quando os sintomas forem leves, ou por não ter penetrado ainda na circulação grande quantidade de veneno ou por ter sido inoculado em pequeno volume, a injeção de sôro pode ser feita por via subcutânea, pois haverá tempo para penetrarem os anticorpos no sangue (o que se dá em mais de 4 horas), à medida que o veneno fôr fazendo o mesmo. A associação de hialuronidase diminuiria o tempo de absorção para cêrca de 3 horas.

Como a relação volume de veneno e pêso corporal é o fator mais importante na gravidade dos envenenamentos, e sendo o volume de veneno teòricamente uma constante, é claro que se deve injetar dose proporcionalmente maior de sôro nos indivíduos de menor pêso, qualquer seja a idade.

A *precocidade* da soroterapia, a *suficiência* da dose que deve ser injetada de *uma só* vez e a *via* de aministração são os fatôres fundamentais na eficácia do tratamento dos envenenamentos ofídicos, além da especificidade do sôro empregado.

Doses de soros — Nos casos graves, injetar no mínimo sôro capaz de neutralizar 100 mg de veneno, sendo 50 mg por via venosa e 50 mg por via subcutânea.

Nos leves, metade da dose anterior, por via subcutânea.

A distinção entre caso grave e leve é feita pela intensidade dos sintomas. Logo após a picada ou até cêrca de 1/2 hora depois, ainda nem

sempre há tempo para manifestação de sintomas orientadores; nesses casos, considerar como graves tôdas as picadas por cascavel, pois a mortalidade do acidente crotálico é muito elevada e é preciso evitar o risco de perda de tempo, que é irrecuperável.

A injeção de sôro em tôrno da picada é contra-indicada nos acidentes botrópicos pois não só não evita a necrose, como também lhe aumenta a incidência, conforme experimentalmente observado.

Complicações da soroterapia — Existe o risco de choque analifático ao sôro que além de muito raro, pode ser evitado pela verificação da suscetibilidade, pingando na conjuntiva 1 gôta de sôro a injetar. No caso de haver hiperemia acentuada, pode ser feita dessensibilização com doses subcutâneas crescentes, a partir de 1 ml com períodos de 15 a 30 minutos. A doença do sôro, também rara atualmente, devido à purificação dos soros, pode ser tratada com êxito pelos anti-histamínicos.

TRATAMENTO SECUNDÁRIO

Medidas auxiliares — De modo geral deve ser evitada movimentação geral e do membro atingido. Incisões no lugar da picada para sangrar e fazer sucção a fim de eliminar veneno só são úteis dentro dos primeiros minutos até cêrca de 1/2 hora depois do acidente. Só pode ser empregue o garroteamento durante êsse período e para êsse fim, caso contrário é medida contraproducente, agravando a necrose ou o risco de choque ao ser desfeito.

Medicação coadjuvante — Bebidas estimulantes quentes e açucaradas devem ser administradas logo no início, assim como é necessário combater o temor e a depressão psíquicas.

Anti-histamínicos por via oral ou injetável conforme a gravidade, assim como analépticos são sempre indicados. Analgésicos ou hipnóticos podem ser dados quando necessário, desde que não haja taquipnéia ou outro sinal de depressão respiratória.

É importante vigiar e combater prontamente o colapso periférico com a terapêutica habitual.

A síndrome de néfron inferior deve ser tratada pelos métodos usados correntemente, sendo aconselhável apenas intervenção menos drástica, guiando-se mais pela sintomatologia clínica.

O tratamento local e geral com antibióticos, assim como a limpeza de tecidos mortificados quando houver lesão, deve ser feito para evitar infecção secundária.

Quanto aos corticóides, não há evidência de que sejam úteis.

ARANHAS E ESCORPIÕES

A soroterapia nos casos de Ctenidae e de escorpiões só é indicada quando houver dor muito acentuada e sinais clínicos de gravidade. Deve

ser usada a via venosa quando a sintomatologia sugerir risco de morte, pois as vias subcutânea e intramuscular são demasiadamente lentas para êsses casos. Existem para êsse fim sôro "antictênico" e o "antiescorpiônico", em ampolas de 5 ml.

O sôro "antilicósico" não tem prevenido a necrose nos casos clínicos em que tem sido aplicado, porém pode ser usado em casos de picadas por Lycosidae e Sicariidae.

A dor é o sintoma principal nos casos de Ctenidae e escorpiões e deve ser combatida enérgica e prontamente com analgésicos e sedativos de atividade proporcional à dor. Também a analgesia local com novocaína a 1% é útil, assim como o gluconato de cálcio por via venosa.

Os anti-histamínicos são sempre indicados. Os antibióticos devem ser empregues quando houver sinal de lesão local, para evitar ou combater a infecção.

INSETOS DIVERSOS

Lacraias, lagartas urticantes, formigas, marimbondos e abelhas podem provocar dor intensa e reação local do tipo histamínico. Tratam-se com anti-histamínicos por via oral ou injetável, de acôrdo com a intensidade dos sintomas. Pomadas analgésicas são úteis.

Em indivíduos picados anteriormente por marimbondos e abelhas, em quem resultou hipersensibilidade, novo acidente pode ter como conseqüência morte rápida por choque anafilático. A injeção intramuscular ou intravenosa de anti-histamínicos, feita prontamente, provoca remissão rápida dos sintomas. É aconselhável associar a adrenalina.

PROGNÓSTICO

Nas picadas por *Crotalus durissus terrificus*, a mortalidade dos casos não tratados com sôro chega a 73%, enquanto em tratados tem atingido cêrca de 25%. Esta última cifra de mortalidade corresponde aos casos que só iniciaram a soroterapia além de 4 horas depois da picada. A intensidade da anúria nos 3.º e 5.º dias é o melhor indício para o prognóstico. Em geral, anúria até 100 ou 200 cm^3 de urina nas 24 horas é sinal de prognóstico fatal, enquanto o aparecimento de diurese abundante, nessa fase, permite prever a cura mesmo que a sintomatologia seja grave.

Nas picadas por serpentes do gênero Bothrops, a mortalidade entre os não medicados com sôro é de cêrca de 8% e, é mínima naqueles em que foi feita soroterapia, só atingindo os tratados tardiamente 6 a 10 horas depois do acidente.

A mortalidade por aranhas é muito reduzida e ocorre em indivíduos ou muito debilitados ou de pequeno pêso, devendo concorrer para o êxito letal a intensidade do sofrimento causado pela dor (Ctenidae) ou pela síndrome ictero-hemolítica (Loxosceles).

No caso dos acidentes escorpiônicos a mortalidade atinge porcentagens apreciáveis (próximo de 6% sem soroterapia), especialmente em crianças. O prognóstico fatal é previsível pela intensidade dos sintomas clínicos em que a dor, tal como nos acidentes por aranhas, é um dos componentes mais importantes.

SEQÜELAS

Nos acidentes crotálicos e elapídicos, após a cura não permanece qualquer lesão orgânica; o mesmo se dá com os picados por aranhas e por escorpiões.

Nos casos de acidente botrópico ocorrem cêrca de 14% de necroses locais, algumas das quais deixam como conseqüência perda de tecidos ou cicatriz. As Lycosas e Loxosceles também podem deixar como conseqüência cicatriz cutânea.

Além dêsses não há outros sintomas tardios atribuíveis à conseqüência de picadas por animais peçonhentos.

PROFILAXIA

IMUNIZAÇÃO

Não é possível na prática imunizar ativamente o homem contra o veneno de serpentes peçonhentas, pois os cavalos, utilizados para preparar sôro imune, não só têm suas condições gerais afetadas pelas repetidas inoculações de veneno imunizador, como também depois de um intervalo de alguns meses baixa notàvelmente o nível de anticorpos no sangue dêsses animais.

Como no envenenamento por picada de ofídio a dose total de toxina é inoculada de uma só vez, seria necessário que o indivíduo estivesse no acme da concentração de anticorpos no sangue, não havendo tempo portanto para que o veneno inoculado servisse de novo estímulo para produção de antiveneno (injeção de "rapel"). Difere assim essencialmente das imunizações ativas contra injeções por microorganismos, em que a progressão lenta do agente patogênico e de suas toxinas dá tempo suficiente à elevação dos anticorpos que as neutralizarão.

SERPENTES

A grande maioria dos acidentes por serpentes num total de 71,40% ocorre por picadas no pé e até o têrço inferior da perna; verifica-se por aí que o simples uso de botinas evitaria quase três quartos dos acidentes ofídicos. Se incluirmos também as picadas do têrço médio e do têrço superior da perna, êsse total se elevará a 76,72%, isto é, o uso de

botas altas aumentaria ainda mais a proteção. A proteção pelo calçado é realmente muito grande, pois as prêsas não perfuram o couro usado normalmente. O tecido das calças pode diminuir bastante o risco, pois, além de sua espessura e da distância que fica da pele, dá possibilidade de proteção que, se não é total, é útil, inclusive porque as prêsas podem ficar embaraçadas no pano. Certa atenção ao manipular, em lugares propícios às serpentes, diminuiria muito o número total de acidentes, pois, entre os que ocorrem nos membros inferiores, nas mãos e nos punhos, se totalizam 96,41% das picadas por serpente. O restante é que pode ser atribuído a reais acasos. O conhecimento, mesmo que rudimentar, dos lugares preferidos pelas cobras, como foi esclarecido anteriormente, mais êsses fatos expostos, facilitará bastante a prevenção dêsses desagradáveis e perigosos acidentes. Há a assinalar ainda o fato de que a grande maioria das picadas sofridas por cães ocorre no focinho e na face anterior das pernas dianteiras (segundo verificações feitas pelos boletins de comunicação de acidentes recebidos pelo Instituto Butantã). Isso sugere que êsses animais em geral percebem e atacam as serpentes venenosas e não são habitualmente surpreendidos por elas. Conseqüentemente, a companhia de um cão que vai na dianteira pode representar boa medida de segurança ao andar em capinzais ou lugares parcialmente recobertos por vegetação que não permitem boa visibilidade do caminho.

ARANHAS E ESCORPIÕES

A análise sumária da freqüência das circunstâncias em que ocorreram picadas por aranhas venenosas é útil para evitar a maioria dos acidentes. Cêrca de 23% das picadas ocorrem ao introduzir o pé nos calçados e perto de 27% lidando com roupa, móveis, etc., no interior de casa.

Quanto aos escorpiões, como preferem ficar em lugares sombrios e úmidos ou frescos, como debaixo de paus, tijolos e entulhos, diminuir-se-á bastante o risco tomando certo cuidado ao manipular nessas condições, já que na quase totalidade de acidentes observada no Hospital Vital Brasil a picada fôra nas mãos.

Agradecemos ao Dr. W. Bucherl as relações das aranhas e dos escorpiões e, ao Dr. A. R. Hoge, as de serpentes utilizadas para elaborar os quadros de distribuição geográfica.

BIBLIOGRAFIA

AMORIM, M. de F., MELLO, R. F. de e SALIBA, F. — 1951. Envenenamento botrópico e crotálico. Contribuição para o estudo experimental comparado das lesões. Mem. Inst. Butantan, *23:* 63.

AMORIM, M. de F. e MELLO, R. F. de — 1952. Nefrose do néfron intermediário no envenenamento crotálico humano; Estudo anátomo-patológico. Mem. Inst. Butantan, *24:* 281.

BOQUET, P., BUSSARD, A. e IZARD, Y. — 1952. Influence de l'hyaluronidase sur les propriétés therapeutiques du serum antivenimeux. An. Inst. Pasteur, *83:* 640.

BÜCHERL, W. — 1953. Dosagem comparada da atividade dos extratos glandulares e do veneno puro da *Phoneutria nigriventer* (Keyserling), 1891. Mem. Inst. Butantan, *25:* 1.

BÜCHERL, W. — 1953. Escorpiões e Escorpionismo; II Atividade das peçonhas de *Tityus serrulatus* e *T. bahiensis* sôbre camundongos, *25:* 83.

DINIZ, C. R. — 1958. Efeitos farmacológicos do veneno de escorpião. X Reunião Anual da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência, S. Paulo.

FONSECA, F. da — 1949. Animais Peçonhentos. Instituto Butantan, S. Paulo.

HENRIQUES, O. B., LAVRAS, A. C., FICHMAN, M., MANDELBAUM, F. R. e HENRIQUES, S. B. — 1958. The proteolytic activity of the venom of *Bothrops jararaca*. Bioch. Journal, *68:* 597.

HENRIQUES, O. B., MANDELBAUM, F. R. e HENRIQUES, S. B. — 1958. Estudos relativos à atividade coagulante do veneno de *Bothrops jararaca*. X Reunião Anual da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência, S. Paulo. Ciência e Cultura, *10:* 164.

KLOBUSITZKY, D. von e KÖNIG, P. — 1935-1936. Estudos Biochimicos sôbre os venenos das serpentes do gênero Bothrops; III. Separação do princípio coagulante dentre a Bothropotoxina e outras substâncias contidas na secreção natural. Mem. Inst. Butantan, *10:* 223.

MOURA GONÇALVES, J. — 1951. Eletroforese de proteínas. Instituto de Biofísica da Universidade do Brasil.

ROCHA E SILVA, M., BERALDO, W. T. e ROSENFELD, G. — 1949. Bradykinin, a Hypotensive and Smooth Muscle Estimulating Factor Released from Plasma Globulin by Snake Venoms and by Trypsin. Am. J. Physiol., *156:* 261.

ROSENFELD, G., NAHAS, L., CILLO, D. M. e FLEURY, C. T. — 1958. Envenenamentos por serpentes, aranhas e escorpiões, *in* Cintra do Prado, F., Ramos, J. e Valle, J. R. Atualização Terapêutica, Livraria Luso-Espanhola e Brasileira, Rio.

ROSENFELD, G., HAMPE, O. G. e KELEN, E. M. A. — 1958. Comparação da Acão Coagulante e Fibrinolítica de venenos ofídicos. X Reunião Anual da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência, S. Paulo. Ciência e Cultura, *10:* 221.

ROSENFELD, G., KELEN, E. M. A. e NAHAS, L. — 1958. Regeneration of Fibrinogen after Defibrination by Bothropic Venom in Man and in Dogs. Relationship with Clotting and Bleeding Time. Rev. Clincia de S. Paulo (Sanguis), *34:* 36.

SLOTTA, C. H. e FRAENKEL-CONRAT, H. L. — 1938-1939. Estudos químicos sôbre os venenos ofídicos; 4, Purificação e cristalização do veneno da cobra cascavel. Mem. Inst. Butantan, *12:* 505.

SWAROOP, S. e GRAB, B. — 1956. The Snakebite mortality Problem in the World, in, Buckley, E. E. and Porges, N., Venoms. Am. Ass. Adv. Sciences, Washington.

Reprinted from:

ACTA PHYSIOLOGICA LATINOAMERICANA, 11: 135-140, 1961

ABSENCE OF ACTIVITY OF ESTROGEN AND ANDROGEN HORMONES ON THE PROTHROMBIN COMPLEX OF DOGS TREATED WITH DICOUMAROL *

G. ROSENFELD and L. NAHAS
(Laboratory of Hematology, Instituto Butantan, São Paulo, Brasil)

THE good clinical results published by Birch (1) concerning the treatment of hemorrhages in hemophiliacs with female hormones induced clinical and experimental investigation with the aim of elucidating the mechanism of the action of these hormones on blood coagulation. Clinical observations of Jacobson (5), Menger (10) and Schersten (13), related that they succeeded to control hemorrhage of epistaxis or tonsillectomy about half an hour after intravenous or intramuscular injections of 20 to 40 mg of estrogens.

In relation with bleeding and coagulation times it was related by Hirst (4) that new-born children submitted during 12 days to injections of different dosis of an estrogen (Theelin) had shown a shortening of 1-2 minutes of the bleeding and coagulation times which ranged between 3½ and 4 minutes before the treatment.

The behaviour of the platelets was investigated by Larizza and Cioffari (7) who did not find any manifest increase after 14 days of daily injections of 1 to 5 mg of stilbestrol.

From their observations in women Larizza and Rovello (8) stand that stilbestrol administered intramusculary or intravenously do not produce any changes in prothrombin and recalcification times. But Johnson (6) related an increase of prothrombin and Ac-Globulin (Factor V) in dogs injected intravenously with 10 mg of conjugated estrogens, and also a simultaneous reduction of plasma antithrombin leading to a potential increase of thrombin. Fumarola (3) obtained an increased blood coagulability in rabbits injected with testosterone, but the results were evident by thromboelastography and not so clear by the determination of prothrombin, factor VII or thromboplastin activity. Laurentaci (9) made a good review of the bibliography in which it was clearly shown the divergence in the subject. He related that estrogens produce an increase of the blood coagulability in males.

Due to the discordance between the results related, this work was made to study the eventual influence of male and female hormones on the factors of the prothrombin complex. The experiments were made in animals treated with dicoumarol to see if these hormones were able to counterbalance the reduction produced by the anticoagulant or accelerate the regeneration of factor VII and prothrombin.

* This work was supported by the Research Fund of the Instituto Butantan (F.P.I.B.) and the National Council of Research (C.N.Pq.).

Received for publication, June 16th, 1961.

Material and methods

The experiments were carried out with dogs submitted to treatment with dicoumarol. In accordance with the type of hormone used and the phase of dicoumarol treatment, the animals have been divided into several groups indicated below:

A — Intramuscularly applied liposoluble androgen and estrogen hormones.

1) 3 dogs injected with 5 mg of estradiol hexahydrobenzoate * on the 5th day of dicoumarol administration
2) 5 dogs injected with 5 mg of estradiol benzoate ** on the 5th day
3) 5 dogs injected with 50 mg of testosterone hexahydrobenzoate *** on the 5th day
4) 8 dogs injected with 100 mg of testosterone hexahydrobenzoate on the 5th day
5) 4 dogs injected with 50 mg of testosterone hexahydrobenzoate on the lst day
6) 4 dogs injected with 5 mg of estradiol hexahydrobenzoate on the lst day
7) 4 dogs submitted to dicoumarol treatment during 4 days but not injected with hormones (control group)

B — Intravenously applied hydrosoluble conjugated estrogenic hormones ****

1) 4 dogs injected with a single dose of 10 mg of estrogens
2) 4 dogs injected with doses of 10 mg of estrogens on 2 consecutive days
3) 4 dogs submitted to dicoumarol treatment during 1 day but not injected with hormones (control group).

All the dogs of group A were orally treated with 4 consecutive daily dosis of 100, 50, 25 and 25 mg of dicoumarol *****, whereas those of group B received a single dose of 100 mg. In the first group, the determinations of prothrombin time by Quick's method have been made before the beginning of dicoumarol treatment and at daily intervals during the entire experimental period up to the complete regeneration of the prothrombin complex which, at the applied doses of dicoumarol, has been dropping to less than 1 per cent of its normal value. As to the second group, the determinations have been carried out before and, subsequently, 15, 30, 60, 90, 120, 180 and 240 minutes after the injection. The graphs indicate percentage of prothrombin times related to normal plasma taken as 100 per cent. Each point of the curve represents an average of the percentages of the respective group.

Results

The treatment of 4 dogs with 200 mg of dicoumarol given at rates as indicated under Methods for group A has

* "Benzo-Gynestril A.P.".
** "Benzo-Gynestril".
*** "Sterandryl A.P.".
The 3 hormones referred to above have been supplied by Laboratories Silva Araujo Roussel, to whom we express our acknowlegment.

**** "Premarin".
***** The dicoumarol has been supplied by Andromaco Laboratories, to whom we express our acknowlegment.

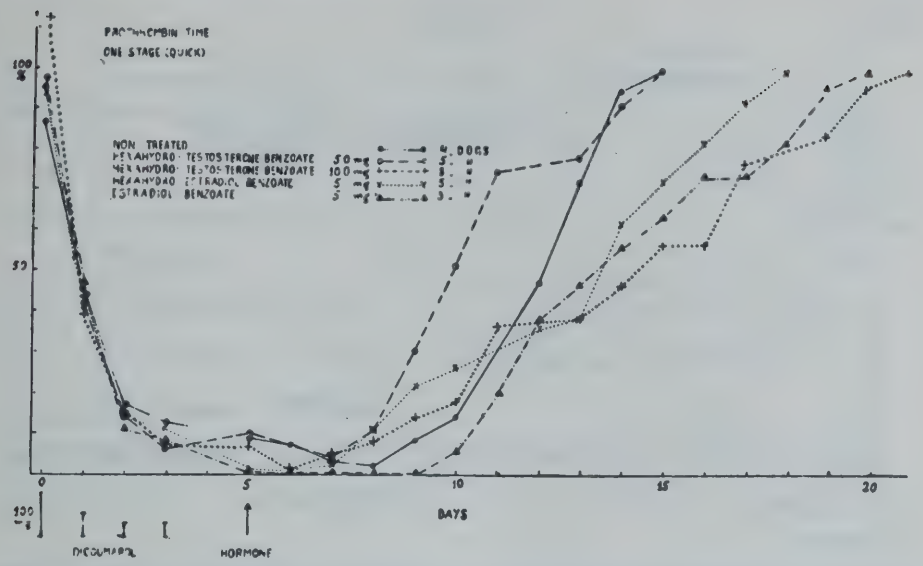


FIG. 1.—*Prothrombin time (percentage) of dicoumarolized dogs injected with hormone on the 5th day. Each point of the curve represents the average of the group.*

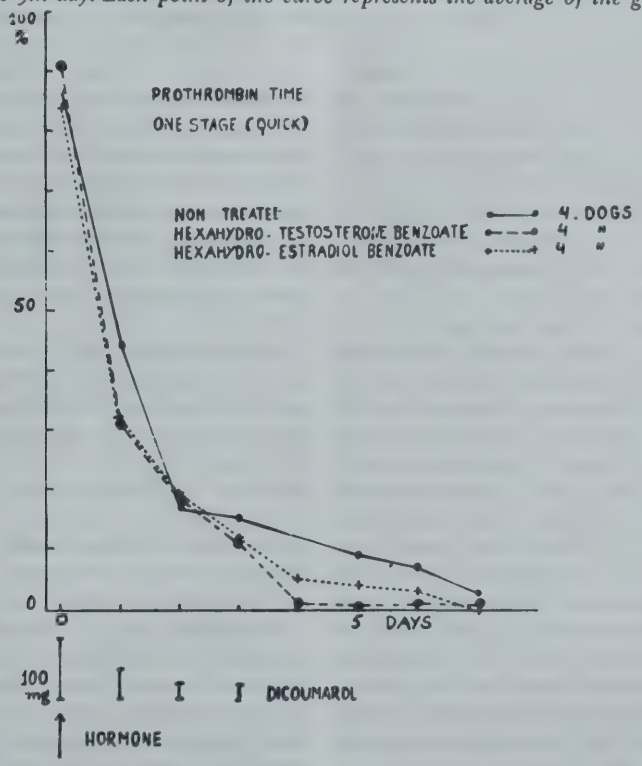


FIG. 2.—*Prothrombin time (percentage) of dicoumarolized dogs injected with hormone on the 1st day. Each point of the curve represents the average of the group.*

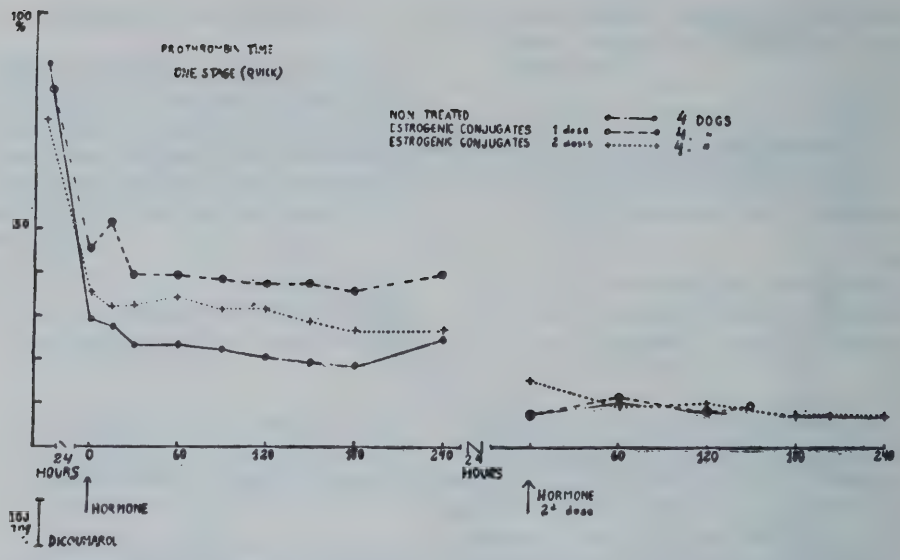


FIG. 3.—*Prothrombin time (percentage) of dicoumarolized dogs injected with intravenous estrogenic hormones 24 and 48 hours after dicoumarol. Each point of the curve represents the average of the group.*

produced a very marked reduction in the elements of the prothrombin complex, arriving at its minimum value (1-10 per cent) between the 5th and 8th days. In the control group regeneration of the factors affected by the drug has reached its normal value on the 15th day (Fig. 1).

The treatment applied on the 5th day by a single injection of 5 mg estradiol hexahydrobenzoate (3 dogs), 5 mg of estradiol benzoate (5 dogs), or finally, of 100 mg of testosterone hexahydrobenzoate (8 dogs) have not changed the regeneration of the factors of the prothrombin complex. Though a slight acceleration of regeneration has been observed after the application of 50 mg of testosterone hexahydrobenzoate (5 dogs), this cannot be attributed to have taken place owing to the drug, but to a mere variation, for the group of 8 animals that had received the double of this dose has not shown the same results (Fig. 1).

On the 11th day, when the differences of the regression of the prothrombin time was more marked (Fig. 1) for a more accurate evaluation, a statistical analysis was made as shown in table 1 and 2 and it was confirmed that really treatment did no produce any significant improvement in the prothrombin time.

On the other hand, neither 50 mg of testosterone hexahydrobenzoate (4 dogs) nor 5 mg of estradiol hexahydrobenzoate injected on the lst day of the treatment, have shown any effect on the decrease of the factors of prothrombin complex since the behaviour of the injected animals has been exactly the same as that of those of the control group (4 dogs) (Fig. 2).

Another group of 4 dogs has been submitted to a single treatment with a dose of 10 mg of dicoumarol (group B). After 24 hours a marked reduction of the prothrombin complex has been observed, reaching a level of 28 per cent,

TABLE I

Means of the prothrombin time, in percent of normal on the 11th day.

Lot Nº	Treatment	Nº of Dogs	Mean	Standard deviation	Standard error of mean
1	Non treated	4	31,5	46,02	23,05
2	H. Testosterone 50 mg ...	5	68,4	45,52	20,32
3	H. Testosterone 100 mg ...	8	27,6	32,14	11,36
4	Estradiol 5 mg ...	3	20,0	20,12	11,69
5	H. Estradiol 5 mg ...	5	31,4	39,77	17,75

whereas, after 48 hours, it has dropped to 7 per cent. Two other groups, both of 4 dogs each treated with dicoumarol in the same way have been intravenously injected with estrogen hormone, 24 hours after the application of the anticoagulant; prothrombin time was determined 15, 30, 60, 180 and 240 minutes later. No effect on the prothrombin complex has been obtained by this treatment. Twenty four hours later, i.e., 48 hours after dicoumarol treatment, one of the groups consisting of 4 animals received another intravenous injection of 10 mg of the same estrogen and the determination carried out after 60, 120, 180 and 240 minutes indicated no modification in the prothrombin time (Fig. 3).

Discussion

The eventual variations concerning factors V, VII and prothrombin as a result of estrogen hormone effects referred to in accounts of various research works carried out by Rovello and Larizza ([8]), Paoletti ([11]), Fumarola ([3]) and Johnson ([6]) were studied in practically normal women and animals. Owing to this it is rather difficult to accept the slight variations indicated to have been obtained in determinations of prothrombin times as valid either in cases of an alleged reduction referred to by Johnson ([6]) or in observations made by Larizza and Rovello ([8]).

As a result of the application of the method outlined in the present work the results become much more convincing. By diminishing the concentration of elements of the prothrombin complex, which, in the case of dicoumarol treatment have been "factor VII" and "prothrombin", any inhibition of the reduction or an acceleration of the regeneration of the elements concerned, could have been easily verified since when the concentration of these factors is low, large fluctuations in prothrombin times by Quick's test are significantly evident. Factor X which is also diminished by coumarins was not involved in these experiments as it is of no influence on the Quick test ([2]).

The results obtained in the present work clearly demonstrate the absence of any effect of estrogen or androgen hormones upon "factor VII" or "prothrom-

TABLE II

Means Compared	Standard error of the difference	"t"	Degrees of Freedom	$t_{0,05}$
M_1 and M_2	30,60	1,20	7	2,365
M_1 and M_3	22,76	0,17	10	2,228
M_1 and M_4	28,90	0,39	5	2,571
M_1 and M_5	28,55	0,0035	7	2,365
M_2 and M_3	21,40	1,91	11	2,201

Comparison between the means of prothrombin time, in percent of normal, on the 11th day and significance ("t" test) between the differences.

bin". It was not observed any activity of these hormones either in the sense of accelerating their regeneration or of impeding their reduction after dicoumarol treatment. Not even conjugate estrogens applied intravenously have they released any eventual reserves of factor VII or prothrombin that might have been present in any organ.

Summary

Dogs were treated with 200 mg of dicoumarol in order to diminish the blood concentration of factor VII and prothrombin; afterwards they were injected with estrogen and androgen hormones. Comparison made with the control group showed that the hormones, when applied on the 5th day did not accelerate the regeneration of the factors affected by dicoumarol, nor were they shown to be able to influence the reduction rate of the factors concerned, when simultaneously administered with the anticoagulant.

In dogs submitted to a single treatment with dicoumarol, intravenous injections of water-soluble conjugated estrogens proved to be incapable of stimulating the production or eventual release of factors of the prothrombin complex within 24 hours.

Bibliography

(1) Birch, C. L.: *J. Amer. med. Ass.*, 1932, *22*, 1566.
(2) Flückiger, P., Duckert, F. and Koller, F.: *Schweiz. med. Wschr.*, 1954, *84*, 1127.
(3) Fumarola, D.: *Riv. di Biol.*, 1956, *48*, 159.
(4) Hirst, J. C.: *Amer. J. Obstet. Gynec.*, 1933, *26*, 217.
(5) Jacobson, P.: *Arch. Otolaring.* 1954, *59*, 523.
(6) Johnson, F. J.: *Proc. Soc. exp. Biol.*, N.Y., 1957, *94*, 92.
(7) Larizza, P. & Ciaffari, A.: *Hematologica*, 1949, *32*, 333.
(8) Larizza & Rovello, F.: *Hematologica*, 1948, *31*, 711.
(9) Laurentaci, G.: *Folia Endocrinol.*, 1957, *10*, 709.
(10) Menger, H. C.: *Jour. Amer. med. Ass.*, 1955, *159*, 546.
(11) Paoletti, I.: *Riv. ital. Ginec.*, 1956, *39*, 399.
(12) Rosti, P. & Furian, R.: *Haematologica*, 1951, *53*, 447.
(13) Schersten, B.: *Serviço de Informações Médicas Ayerst*, 1959, *22*, 1.

Reprinted from: CIÊNCIA E CULTURA, 13: 225-230, 1961

Análise imunologica (micro-difusão em gel) de venenos individuais de Bothrops jararaca(*)

S. Schenberg

(Lab. de Fisiologia, Instituto Butantan, São Paulo, C. P. 65, Brasil)

As pesquisas com venenos ofídicos são grandemente influenciadas pelos critérios morfológicos de classificação. Assim, os venenos individuais de uma mesma espécie são considerados como tendo a mesma composição qualitativa. Baseando-se nesse conceito, dedica-se pouco cuidado à proveniência e composição dos venenos que são misturados para constituirem os "pools" utilizados nas pesquisas e imunização.

Entretanto, a composição dos venenos individuais é de grande importância para os diversos ramos da biologia, diretamente interessados nos venenos ofídicos. Na medicina, a verificação de um componente tóxico em determinados venenos individuais, com ou sem distribuição circunscrita, poderia modificar a preparação dos antivenenos. Êstes teriam de ser preparados com venenos prèviamente selecionados. Venenos que carecem de alguns componentes, podem ser considerados como frações naturais de "pools", semelhantes às obtidas pelo fracionamento dêstes por processos químicos.

Em nossas investigações com venenos ofídicos, estamos empregando venenos individuais nos quais faltam alguns componentes. Isto nos tem permitido observações novas nos campos da enzimologia, imunologia e herpetologia.

O estudo de venenos individuais requer uma técnica que possa evidenciar um grande número de componentes, em pequenas quantidades dêsse material, como o que é obtido por uma única extração. A micro-difusão em gel satisfaz estas exigências e mostra-se superior à electroforese e cromatografia. Misturas proteicas complexas, como são os venenos ofídicos, após sua separação por difusão em gel, podem ter seus componentes especìficamente revelados por soros anti-ofídicos, dificuldade muitas vezes insuperável nas frações reveladas por eletroforese e cromatografia, às quais, comumente, faltam meios que possam discriminar os componentes nelas encontrados. Esta técnica ainda apresenta outras vantagens: as determinações feitas em lâminas de microscópio ou "slides" fotográficos, após secagem e coloração, podem ser guardadas indefinidamente. Elas ainda podem ser utilizadas como negativos e fotografadas diretamente, com auxílio de máquina ampliadora, em filmes diapositivos de 35 mm, que, ampliados, fornecem fotografias nítidas. As lâminas prestam-se também como diapositivos coloridos e podem ser projetadas diretamente. A técnica é, portanto, simples, rápida, econômica e bastante completa quanto aos dados que permite obter.

No presente trabalho procurou-se verificar a composição imunológica do veneno de extrações individuais de *Bothrops jararaca*. Esta espécie, apesar de ser das mais numerosas e de ter ampla distribuição geográfica, não apresenta diferenças morfológicas que possibilitem sua subdivisão em subespécies. Todavia, os resultados da presente investigação mostram que é grande o número de variedades de venenos nela encontrados.

Os resultados a serem apresentados referem-se apenas à diferenças imunológicas. Não foi ainda verificado se elas correspondem a venenos ativamente diferentes.

Parte experimental

Sôro. Empregámos soros equinos, da produção industrial do Butantan, concentrados por precipitação com sulfato de amôneo e digeridos por pepsina. Dois soros foram escolhidos, entre outros de várias partidas, que condicionavam a formação de espectros com linhas melhor diferenciáveis, os quais foram empregados como padrões em todas as determinações. Um dêles é polivalente (SBP), contendo anticorpos específicos para os venenos de *B. jararaca, B. jararacussu, B. alternata e B. atrox.* O outro é um sôro botrópico monovalente anti-jararaca (SBM). Cada veneno foi ensaiado com os dois soros; o espectro com o SBP permite identificar melhor a maioria das linhas, mas, em alguns casos, o SBM revelava melhor algumas delas, ajudando a identificá-las no espectro obtido com o SBP. Os títulos antitóxicos dos soros foram tomados como indicação de suas concentrações e estas eram diluidas com salina, para que 1 ml neutralizasse 4 mg de veneno de jararaca.

Venenos. Os venenos foram secados no vácuo em temperatura ambiente. Um "pool" de veneno de jararaca foi escolhido entre vários e usado como padrão. A concentração dos venenos empregados, tanto do "pool" quanto dos venenos individuais, foi de 8 mg/ml de salina. Geralmente preparava-se 0,5 ml de solução de veneno em salina, que eram suficientes para, aproximadamente, 12-15 determinações.

(*) Esta pesquisa foi realizada com auxílio concedido pelo FPIB.

Meio de difusão, Em todos os ensaios empregámos o sistema de 3 cubas. Estas tinham 2 mm de diâmetro, e nas determinações com SBP, distavam 3 mm uma das outras; e, com o SBM, 4 mm. As fôrmas-modêlo foram preparadas com tubos de agulha de injeção com 2 mm de diâmetro, fixados a placas de "plexiglass". Lâminas de microscópio ou "slides" de 35 mm foram cobertas com agar (Difco) a 1,5% em salina, contendo mertiolato a 1:10.000. Empregámos 2 ml da solução de agar para as primeiras e 1,5 ml para as últimas. As lâminas de microscópio foram perfuradas 3 vezes, e os "slides", 2 vezes, o que permitia obtermos triplicatas e duplicatas de cada determinação.

As cubas foram enchidas 3 vêzes, mantendo-se um intervalo de 2 hs. entre cada uma destas operações. As lâminas foram conservadas a 25°C, durante 18 hs., em atmosfera saturada com vapor de água; em seguida permaneciam 48 hs. em salina, para difusão do excesso de proteínas não precipitadas, e, duas horas, em água filtrada, para retirada do cloreto de sódio. Finda esta fase de difusão, as lâminas foram secadas em chapas de aço inoxidável, mantidas sôbre banho-maria regulado para 40°C. Uma vez sêcas, as lâminas foram introduzidas em solução de amidoschwarz 10 b (1), onde permaneciam de 4-5 minutos. Logo após, as lâminas foram ràpidamente lavadas em 3 banhos sucessivos de soluções ácido-aceticas novas (1) a fim de retirar excesso de corante. As lâminas permaneciam no último banho durante 14 hs. para melhorar a descoloração do agar, operação que intensifica a coloração das linhas precipitadas, aumentando seu contraste.

Resultados

O presente trabalho consistiu em verificar as diferenças de composição entre venenos individuais comparados com um grande "pool" de venenos da mesma espécie ofídica. As determinações foram feitas com um sistema contendo dois elementos constantes: sôro e "pool" de venenos que constituiam os padrões comparativos. As composições dêsses padrões devem ser imunológicamente correspondentes desde que o sôro é obtido a partir de um grande "pool" de venenos, contendo a mesma composição antigênica do padrão comparativo.

Figuras de algumas das variedades de venenos são reproduzidas para ilustrar o texto. Nelas, a cuba superior esquerda (b 1), continha o veneno individual objeto de estudo; a da direita (b 2), o "pool" padrão, e a inferior (b 3), o sôro padrão. Linhas que só são encontradas do lado correspondente ao veneno padrão, cruzando ou não as linhas do veneno individual, são consideradas como componentes que o "pool" de veneno contém a mais que o veneno individual analisado. As linhas do espectro podem conter mais de um componente, em certos casos mesmo quatro, razão por que preferimos chamá-las de linhas e não componentes. Para facilitar a identificação e descrição, as linhas foram numeradas, em ordem crescente, a partir de b 2. Algumas são formadas pela superposição de mais de um componente, que, sendo discerníveis em alguns casos, tiveram seu número acrescido de um símbolo, para diferenciá-las. A linha 6', só é revelada em determinações onde o SBM é empregado como padrão.

Os venenos individuais podem diferir do padrão em apenas um ou dois componentes a menos, dêle pouco diferindo; outros diferem mais, possuindo a menos que o padrão um número maior de componentes. No total, só 10 linhas apresentam variações quanto à sua presença em venenos individuais. Os elementos carentes combinam-se de vários modos, nos diferentes venenos individuais, donde resulta número de variedades superior a cinquenta.

A fig. 1 corresponde a dois espectros de um mesmo veneno obtidos com o SBP (esquerda) e SBM (direita). Êste veneno individual pode ser considerado como completo em composição quando comparado com o padrão, usando-se o SBP. Sua análise com o SBM demonstra que o padrão contém uma linha (6') a mais. Venenos individuais de jararaca, completos para ambos os soros, também são encontrados.

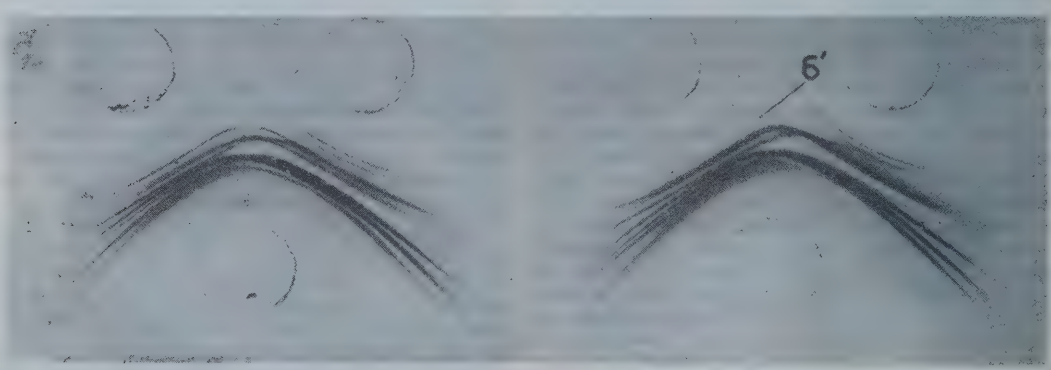


Fig. 1 — O espectro com SBP (esquerda) não demonstra diferenças de composição entre o "pool" e esta variedade. O espectro da direita, com SBM, mostra que a linha 6' não é encontrada nesta variedade.

Na fig. 2 pode-se verificar um veneno que não contém as linhas 1, 2 e 9. A linha 1 é formada por dois componentes que podem ser evidenciados quando êstes venenos são comparados com os de outras espécies botrópicas. A linha 9 também resulta da superposição de 3 ou 4 componentes, e em alguns venenos esta subdivisão pode ser observada. As três linhas desta variedade de veneno são fundamentais para diferenciar venenos das espécies botrópicas. A limitação de espaço impediu que outras fotografias fossem apresentadas, mostrando variedades que carecem apenas de uma destas linhas. Estas podem combinar-se com outras, carentes nos diversos venenos, constituindo muitas variedades, distintas em sua composição.

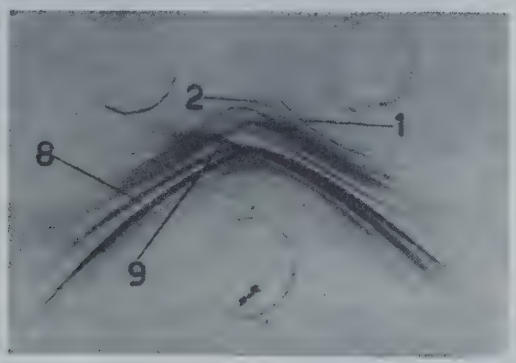


Fig. 2 — Esta variedade não contém as linhas 1, 2 e 9.

A fig. 3 representa o espectro de uma variedade na qual as linhas 1, 2 e 4 não são encontradas. Um componente da linha 8, não assinalado na figura, e que aparece com pouca nitidez, também está ausente neste veneno. A finalidade precípua desta figura é mostrar um veneno sem a linha 4. Esta linha possui dois componentes sendo que um dêles falta neste veneno. São raros os venenos sem esta linha; ela sempre aparece no padrão, nestas concentrações de sôro, como uma nuvem e seu precipitado não é concentrado como o de outras linhas; sua emergência do lado do veneno individual não está bem visível na fotografia. Entre os 240 venenos analisados, não foi encontrada uma única variedade que não possuisse sòmente esta linha.

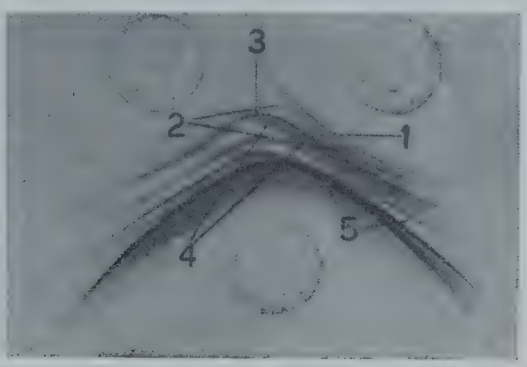


Fig. 3 — Variedade na qual faltam as linhas 1, 2, 4 e 8'. As linhas 4 e 8' estão pouco nítidas, e a 8' não está assinalada com número.

O espectro da fig. 4 mostra um veneno que não contém as linhas 5, 6 e 7. Êste veneno foi o único entre os demais examinados que apresentou-se incolor após secagem, diferindo dos outros, que são amarelos. A particularidade dêste veneno consiste em não possuir a linha 5. Esta é composta por dois componentes, sendo que um dêles parece responsável pela côr amarela dêsses venenos. Não foi ainda verificado se o veneno em apreço contém ofio-L-amino ácido oxidase, que é descrita como estando associada à côr amarela dos venenos. G. Rosenfeld verificou que êste veneno pràticamente não possúi atividade hemolítica, sendo possível que esta atividade esteja associada a um dos componentes desta linha.

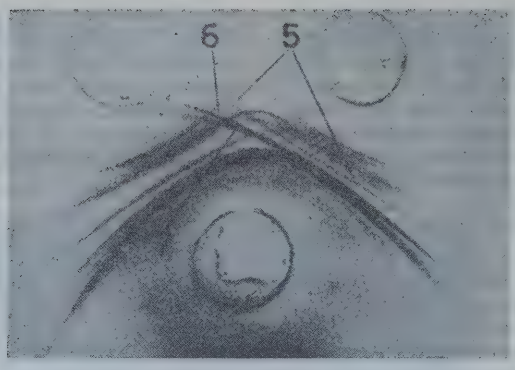


Fig. 4 — As linhas 5, 6 e 7 não são encontradas nesta variedade; êste veneno é incolor.

O veneno da fig. 5 não possúi apenas as linhas 6 e 7, em espectros obtidos com o SBP (espectro da esquerda). O SBM revela que êle também não contém a linha 6′ (espectro da direita). A linha 6 parece ser composta por 2 componentes. A linha 6′, por situar-se próximo da 6, teve seu número acrescido de um símbolo. Os venenos que não possuem a linha 6, geralmente também não possuem a linha 7. Êste fato parece demonstrar que ambas são secretadas pelas mesmas células, razão pela qual, faltando uma, a outra quase sempre também está ausente. A concentração dos componentes destas duas linhas apresenta variações bem significativas. São raros os venenos que só não possuem a linha 6. As 3 linhas carentes neste veneno podem estar associadas a elementos também ausentes em outros venenos, a combinação dêsses elementos nos diferentes venenos multiplica de muito o número de variedades do veneno de jararaca. Venenos que contêm a linha 6′, sem possuirem as 6 e 7, são encontrados frequentemente.

Fig. 5 — Esta variedade não apresenta as linhas 6 e 7 com o SBP (esquerda) e as linhas 6, 6′ e 7 com o SBM. (direta).

As variedades de venenos representadas na fig. 6, exemplificam venenos nos quais os componentes 8 e 8′ da linha 8 estão ausentes. No espectro esquerdo, os dois componentes da linha 8, superpostos em toda a extensão da linha, separam-se, deixando notar uma bifurcação pouco visível, por ser pequeno o afastamento entre os dois componentes. No espectro da direita, os dois componentes estão bem discriminados. A figura mostra duas variedades de veneno, a da esquerda não possúi as linhas 1 e 8, e a da direita, apenas a linha 8. Esta última variedade possúi a linha 1, que, pela sua pequena concentração está pràticamente invisível. Ela encontra-se bem próxima da cuba b 1.

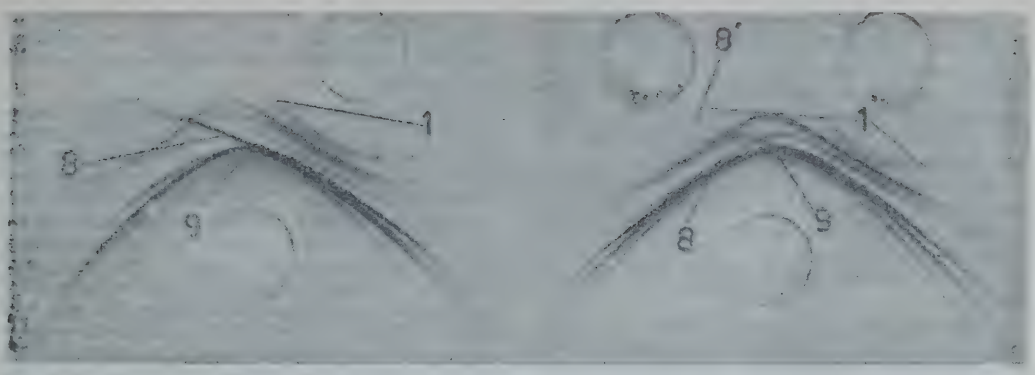


Fig. 6 — (esquerda). Variedade sem as linhas 1 e 8; a bifurcação da linha 8 em seus componentes 8 e 8′ pode ser vista na extremidade superior da linha. (direita). Variedade sem a linha 8; seus componentes 8 e 8′ estão bem visíveis. Êste veneno contém a linha 1 que por sua pequena concentração está pouco visível.

A linha 9 acha-se ausente nas variedades das figs. 2 e 7. Nesta última, as linhas 5, 6, 7 e 9 não são encontradas. Trata-se de uma variedade bastante incompleta em composição quando comparada com o "pool" de veneno padrão. Os venenos das figs. 3 e 7, demonstram bem a variabilidade de composição do veneno de *B. jararaca*. Na variedade da fig. 7, faltam 4 linhas; considerando-se os elementos superpostos destas linhas, pode concluir-se que pelo menos 8 componentes, existentes no "pool", faltam neste veneno individual de jararaca.

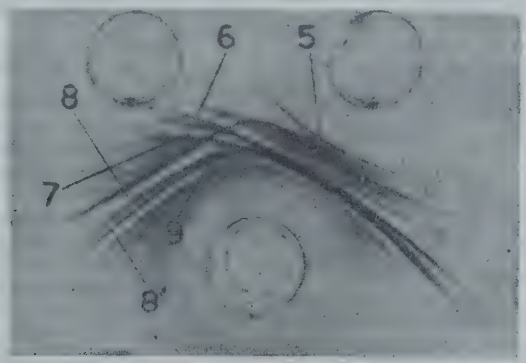


Fig. 7 — Variedade na qual faltam as linhas 5, 6, 7 e 9.

As figuras apresentadas mostram que, excetuando-se a linha 3, todas as outras, de 1 a 9, podem faltar em venenos individuais. Os 240 venenos individuais analisados mostram-se numericamente insuficientes, e não permitem distribuir geogràficamente as variedades encontradas, uma vez que, para cada uma, corresponderia pequeno número de exemplares. Possívelmente só algumas destas variedades obedecerão distribuição bem circunscrita.

Novos "pools" comparativos estão sendo constituidos a fim de permitir um estudo mais minucioso de linhas específicas do espectro. Apesar de a presente investigação estar em fase inicial, já é possível afirmar-se que o número de componentes imunológicos do veneno de *B. jararaca* é superior a 30 e que mais de 50 variedades imunológicas de venenos podem ser demonstradas nesta espécie.

DISCUSSÃO

Os resultados desta investigação parecem estar em contradição com a unidade morfológica da espécie. No entanto, considerando tratar-se de uma espécie dominante, não poderiam ser outros os resultados encontrados, se o problema é analisado dentro do conceito evolutivo darwiniano. Deve-se considerar a possibilidade de que as variedades de veneno encontradas correspondam a novas subespécies em sua fase evolutiva. O sìngular nesses resultados é que a diversificação na constituição dos venenos não tenha permitido, ainda, a verificação, também, de pequenas diferenças morfológicas que correspondám às modificações de composição dos venenos. É possível que, com estudos mais aperfeiçoados, sejam encontradas ligeiras modificações morfológicas, acompanhando de perto as verificadas nos venenos.

Diante do grande número de variações observadas nos venenos individuais, parecendo algumas delas possuir distribuição geográfica circunscrita, deve-se admitir a possibilidade de que outros componentes existam nos venenos de *B. jararaca*, não revelados com os padrões empregados. Seriam venenos que não entram ou entram em pequenas proporções, no "pool". Assim sendo, os padrões não possuiriam os antígenos e anticorpos necessários para revelaram sua presença. Padrões apropriados, preparados com venenos de regiões prèviamente delimitadas, poderiam esclarecer esta hipótese.

A denominação de variedade dada aos espécimens cujos venenos mostram diferenças em sua composição tem justificativas práticas, apesar do grande número de variedades encontradas. No caso de diferenças em componentes já caracterizados, deve-se diferenciar uma variedade contendo, suponhamos, 5-nucleotídase, de outra que não a contenha. Tratando-se de veneno que se diferencia do "pool", em dois ou mais componentes, exemplificando, 5-nucleotídase e ofio-adenosinatrifosfatátase, êle deve ser diferenciado de outra variedade que contenha estas duas enzimas ou apenas uma delas, mas que não possua também a ofio-L-amino ácido oxidase, etc. Deve-se admitir que diferenças em componentes mesmo inativos, mas possuindo distribuição geográfica delimitada, tenham o mesmo valôr taxonômico que os atualmente empregados na classificação herpetológica, como sejam a distribuição de escamas, desenho da pele, etc. Dados dessa natureza, quando não utilizados para diferençar subespécies, servem para suplementar outros dados taxonômicos, o que ainda justifica o emprêgo de "variedade" aqui usada.

Êste trabalho com veneno de *B. jararaca* ainda está em sua fase inicial. Torna-se necessário verificar se uma diferença na composição observada na primeira extração, também será encontrada nas extrações subsequentes, para concluir-se que a diferença corresponde realmente a uma variedade; caso contrário, tratar-se-ia de diferenças de secreção entre duas extrações. Em trabalho anterior com *B. neuwiedii* (2), encontrámos fato semelhante com as linhas **1**, **6**, **6'**, **7** e **8**, na composição de venenos individuais. Elas foram observadas em todas as extrações do mesmo animal, o que permite supormos que, na jararaca, o mesmo fenômeno venha a ser observado. Verificámos, indiretamente, com veneno de jararaca, a uniformidade de composição das extrações de um mesmo animal. Misturámos, com a finalidade de constituir um "pool" específico para determinadas linhas, todas as extrações de várias jararacas, cujos espectros mostravam as linhas **8** e **9** bem separadas. O "pool" resultante mostrou formar espectro onde estas linhas se dispunham de modo idêntico ao observado nas extrações individuais das jararacas empregadas para constituí-lo. Êste fato demonstra, não só identidade qualitativa, mas quantitativa também; de outro modo, as linhas modificariam suas posições no espectro, segundo as diferenças de concentração de seus componentes.

A técnica empregada para evidenciar as variedades descritas, sendo imunológica, possúi grande especificidade molecular. Devemos considerar que diferenças imunológicas não devem obrigatòriamente corresponder a atividades diferentes. Pequenas modificações na estrutura da molécula de um componente ativo podem não corresponder a atividades diferentes do veneno. Esta pode continuar a mesma, o agente responsável por ela é que apresenta pequenas modificações em sua molécula, e estas, não atingindo os radicais responsáveis por sua atividade, não a modificariam de modo sensível, mas seriam suficientes para impedir a formação do complexo antígeno-anticorpo. Neste caso, o padrão pode apresentar-se com mais uma linha, que sabemos corresponder a uma atividade, e o veneno individual, que pelo espectro, não deveria possuí-la, continua apresentando-a.

Na terapêutica com antivenenos, considerações desta natureza podem ser de grande importância. O sôro pode conter anticorpos que neutralizam uma determinada ação tóxica, apresentada pelo veneno de uma serpente responsável por um acidente ofídico, sem que tenha o poder de neutraliza-la, desde que o componente responsável por tal ação, nesse espécimen determinado, tenha pequenas modificações estruturais em suas moléculas.

Sumário

1) — Extrações individuais de veneno obtido de 240 jararacas foram analisadas pelo método de dupla-difusão em gel (micro-difusão). 2) — Algumas modificações na técnica de micro-difusão em gel são apresentadas. 3) — As extrações individuais foram comparadas com padrões de sôro (sôro botrópico mono e polivalente) e com um "pool" de venenos de *B. jararaca*. 4) — Dos vários componentes do veneno de *B. jararaca*, sòmente 10 mostraram variações de presença nos venenos individuais. 5) — O veneno de *B. jararaca* mostrou possuir mais de 30 componentes imunológicos. A combinação dos componentes carentes, nos vários venenos individuais, permitiu verificar a existência de mais de 50 variedades de venenos nessa espécie botrópica. 6) — Fotografias de espectros imunológicos são apresentadas para exemplificar as variedades encontradas. 7) — Os resultados encontrados e seu significado no estudo de venenos são discutidos.

BIBLIOGRAFIA

1) Grasset, E., Bonifas, V. and Pongratz, E. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **97**, 72 (1958). 2) Schenberg, S. Trabalho em publicação.

Queremos agradecer a colaboração técnica de D. Cavalheiro, E. César Campos e P. Villela.

Reprinted from:

ANAIS DOS XI CONGRESSO NACIONAL DE TUBERCULOSE E VI CONGRESSO BRASILEIRO DE DOENÇAS TORÁCICAS, Universidade do Rio Grande do Sul, 1º volume, p. 397-403, 1961

TUBERCULINAS DIVERSAS E SUAS REAÇÕES

Jandyra Planet do Amaral e Urias Cavenaghi

SECÇÃO DE BACTERIOLOGIA DO INSTITUTO BUTANTAN

Apesar da prova de tuberculina já ser usada há tão longo tempo, alguns detalhes em sua técnica ainda merecem a atenção dos que trabalhem no assunto. Sendo ela usada não só como teste auxiliar no diagnóstico da tuberculose, mas também como uma das provas de contrôle para a vacina BCG julgamos de interesse verificar se êsses testes poderiam ser praticados com tuberculinas fabricadas por técnicas diversas.

Em comunicação anterior, Cavenaghi verifica que tanto uma tuberculina purificada, feita com a amostra Moreau, com a qual se prepara a vacina BCG, como uma mista (amostra bovina e humana) produzem reações alérgicas comparáveis em cobaios tuberculosos, desde que sejam estandardizadas ao Padrão Internacional.

Estas duas tuberculinas já estudadas em sua padronização servirão para pesquisas de novos dados.

Trabalhamos sempre com tuberculinas diluidas recentemente, em solução tampão isotônica com Tween 80, e estandardizadas ao Padrão Internacional.

Para o estudo comparativo das reações de dois tipos de tuberculina bruta, de BCG e mista, no diagnóstico da tuberculose, foram inoculados cobaios com 2 mg da amostra H 37 Rv e três mêses após se processaram as provas alérgicas com duas unidades de cada uma das tuberculinas.

Pelo quadro n.º 1 vê-se que as reações podem ser comparáveis para as duas modalidades de tuberculina sendo o diâmetro médio levemente maior para a tuberculina mista.

O quadro n.º 2 especifica as reações com tuberculina purificada, isto é, PPD de BCG e PPD misto.

Lote de cobaios inoculados com H 37 Rv foram testados pela técnica já descrita.

Verificações de 24-48 horas mostram correlação de resultados, os diâmetros médios das reações sendo 11,423 e 11,038 mm.

Para testar a alergia nos cobaios vacinados pelo BCG relativamente as duas tuberculinas, foram utilizados dois lotes de cobaios vacinados com 1 ml de vacina BCG por via sub-cutânea e testados três mêses após.

Para o primeiro lote de cobaios foram feitas inoculações intradérmicas de duas unidades de tuberculina bruta de BCG e tuberculina bruta mista, na mesma ocasião.

As leituras se processaram 24-48 horas após; o quadro n.º 3 mostra que os resultados foram pràticamente iguais, pois os diâmetros médios são absolutamente comparáveis.

Outro lote de cobaios serviu para o confronto das reações com as tuberculinas purificadas (PPD de BCG e PPD misto).

Estas reações são também absolutamente comparáveis.

Todos os cobaios apresentaram escara e as reações foram bastante nítidas com uma média de 8,2 para PPD de BCG e 8,3 para PPD misto. É o que se verifica no quadro n.º 4.

Conclue-se do exposto que poderemos ter resultados comparáveis com diversas tuberculinas para pesquisa da alergia pela tuberculose ou pela vacinação pelo BCG, desde que elas sejam aferidas ao Padrão Internacional.

QUADRO N.º 1

REAÇÕES DE TUBERCULINA BRUTA EM COBAIOS TUBERCULOSOS

10 cobaios inoculados com H 37 Rv — 2 mg — via sub-cutânea				
Cobaio n.º	Tuberculina de BCG 2 UT		Tuberculina 3-61 2 UT	
	24 hs.	48 hs.	24 hs.	48 hs.
3	17 x 16	16 x 14	20 x 20	15 x 15
311	18 x 14	13 x 11	18 x 16	12 x 8
1436	15 x 12	11 x 9	12 x 10	10 x 8
6	14 x 20	12 x 12	15 x 14	13 x 11
7	15 x 13	12 x 10	12 x 11	16 x 17
9	16 x 12	11 x 10	16 x 13	10 x 9
1328	15 x 14	14 x 11	13 x 10	27 x 25
1351	21 x 15	12 x 11	15 x 15	12 x 10
1364	15 x 12	12 x 11	15 x 11	12 x 10
304	21 x 16	24 x 18	16 x 13	22 x 17
Diâmetro médio	15,55	12,7	14,25	13,95

Tôdas as reações apresentaram escara já com 24 horas.

QUADRO n.º 2

REAÇÕES DE TUBERCULINA PPD EM COBAIOS TUBERCULOSOS

13 cobaios inoculados com tuberculose (H 37 Rv — 2 mg SC)

Cobaio n.º	Tuberculina PPD de BCG		Tuberculina PPD de Tbc	
	24 hs.	48 hs.	24 hs.	48 hs.
30	20 x 15 +	15 x 14 +	15 x 15 +	15 x 15 +
29	16 x 14 +	10 x 8 +	20 x 18 +	20 x 13 +
37	17 x 15 +	11 x 11 +	10 x 7 +	12 x 10 +
40	15 x 15 +	11 x 7 +	10 x 10 +	10 x 8 +
38	16 x 14 +	12 x 12 +	10 x 10 +	8 x 8 +
49	15 x 12 +	13 x 9 +	15 x 15 +	13 x 11 +
378	11 x 14 +	10 x 8 +	11 x 11 +	9 x 8 +
1309	15 x 15 +	10 x 10 +	15 x 15 +	12 x 8 +
362	22 x 18 +	21 x 12 +	16 x 16 +	11 x 10 +
1319	20 x 15 +	10 x 8 +	16 x 12 +	10 x 7 +
314	18 x 17 +	16 x 10 +	15 x 11 +	17 x 8 +
33	15 x 13 +	11 x 8 +	15 x 15 +	14 x 11 +
34	18 x 17 +	16 x 15 +	15 x 11	11 x 8
Diâmetro médio	15,846	11,423	13,423	11,038

\+ Escara

QUADRO N.º 3

REAÇÕES DE TUBERCULINA BRUTA EM COBAIOS VACINADOS COM B. C. G.

20 cobaias inoculadas com 1 ml de vacina BCG — via sub-cutânea				
Cobaio n.º	Tuberculina de BCG 2 UT		Tuberculina 3-61 2 UT	
	24 hs.	48 hs.	24 hs.	48 hs.
71	11 x 10	10 x 10	12 x 9	12 x 10
73	13 x 8	8 x 8	12 x 7	13 x 7
75	12 x 8	11 x 8	12 x 9	11 x 8
77	13 x 9	10 x 7	12 x 8	11 x 7
80	12 x 10	10 x 9	10 x 5	8 x 5
92	10 x 8	10 x 7	10 x 8	10 x 7
108	10 x 10	9 x 9	10 x 10	9 x 9
109.	10 x 11	9 x 8	12 x 8	10 x 7
110	12 x 10	11 x 10	11 x 11	10 x 9
1871	11 x 9	10 x 7	11 x 8	10 x 7
82	10 x 9	9 x 8	10 x 10	11 x 10
83	11 x 8	8 x 7	8 x 8	9 x 7

(Continúa na pág. seguinte)

(Continuação da pág. anterior)

Cobaio n.º	Tuberculina de BCG 2 UT		Tuberculina 3-61 2 UT	
	48 hs.	24 hs.	48 hs.	24 hs.
87	11 x 10	12 x 9	12 x 12	12 x 8
95	12 x 7	8 x 6	12 x 9	9 x 7
98	11 x 9	11 x 10	11 x 10	10 x 10
111	15 x 9	13 x 11	12 x 9	12 x 10
112	10 x 9	10 x 8	10 x 10	9 x 8
114	7 x 6	8 x 7	10 x 9	10 x 8
1843	14 x 12	12 x 10	12 x 11	11 x 9
1876	11 x 8	10 x 7	11 x 10	10 x 8
Diâmetro médio	10,15	9,15	10,025	9,2

Tôdas as reações apresentaram escara já com 24 horas.

QUADRO N.º 4

REAÇÕES DE TUBERCULINA PPD EM COBAIOS VACINADOS COM B. C. G.

20 cobaios inoculados com B C. G. — 20 mg SC				
Cobaio n.º	Tuberculina PPD de BCG		Tuberculina PPD de Tbc	
	24 hs.	48 hs.	24 hs.	48 hs.
55	10 x 8 +	10 x 7 +	10 x 8 +	10 x 8 +
58	11 x 11 +	10 x 8 +	11 x 8 +	9 x 8 +
96	9 x 7 +	6 x 6 +	11 x 10 +	10 x 9 +
103	8 x 9 +	7 x 6 +	9 x 9 +	8 x 7 +
1881	13 x 10 +	11 x 9 +	11 x 9 +	9 x 8 +
53	11 x 8 +	10 x 7 +	10 x 9 +	9 x 8 +
51	13 x 9 +	9 x 7 +	11 x 12 +	10 x 9 +
60	13 x 8 +	10 x 6 +	14 x 11 +	8 x 7 +
59	9 x 8 +	9 x 7 +	11 x 10 +	9 x 7 +
1894	9 x 7 +	7 x 6 +	8 x 8 +	8 x 8 +
107	11 x 8 +	9 x 9 +	12 x 9 +	9 x 9 +
61	10 x 10 +	10 x 8 +	10 x 9 +	7 x 8 +

(Continúa na pág. seguinte)

(Continuação da pág. anterior)

Cobaio	Tuberculina PPD de BCG		Tuberculina PPD de Tbc	
n.º	24 hs.	48 hs.	24 hs.	48 hs.
70	8 x 9 +	8 x 9 +	11 x 10 +	6 x 8 +
105	10 x 9 +	8 x 7 +	10 x 9 +	8 x 8 +
63	9 x 8 +	9 x 9 +	12 x 11 +	10 x 9 +
66	13 x 12 +	9 x 8 +	12 x 12 +	9 x 7 +
106	10 x 9	8 x 7	13 x 10	10 x 8
65	8 x 7 +	9 x 7 +	8 x 7 +	7 x 7 +
64	12 x 11 +	10 x 8 +	14 x 12 +	11 x 8 +
104	11 x 9 +	9 x 9 +	11 x 10 +	9 x 8 +
Diâmetro médio	10,525	8,2	10,2	8,375

\+ Escara

Resumo: Foram estudadas quatro modalidades de Tuberculina e experimentadas, no seu poder de produzir reações alérgicas, em cobaios com infecção tuberculosa e em cobaios vacinados com B. C. G.

Conclui-se que, se as diferentes tuberculinas tiverem suas unidades testadas ao Padrão Internacional, poderão ser utilizadas na pesquisa da alergia com resultados pràticamente iguais.

Reprinted from:

ANAIS DOS XI CONGRESSO NACIONAL DE TUBERCULOSE E VI CONGRESSO BRASILEIRO DE DOENÇAS TORÁCICAS, Universidade do Rio Grande do Sul, 1º volume, p. 393-395, 1961

PRODUÇÃO E ESTANDARDIZAÇÃO DE TUBERCULINA PURIFICADA

URIAS CAVENAGHI

Assistente da Secção de Bacteriologia
do Instituto Butantan

O laboratório de Bacteriologia do Instituto Butantan, entre outros produtos, prepara tuberculina, a qual é distribuida para os serviços de tuberculose do Estado de São Paulo. Para tal fim, torna-se necessário que a tuberculina por nós produzida, apresente sempre a mesma potência, em produzir alergia tuberculínica; assim sendo tôdas as partidas são sistemàticamente aferidas ao "Padrão Internacional".

Ùltimamente as técnicas para a produção de tuberculina têm sido objeto de vários estudos, visando sua purificação; pela observação atenta dos vários trabalhos destacamos duas técnicas que nos pareceram as principais: e de Seibert e a de Green.

A técnica descrita por Seibert consiste em se fazer as culturas em caldo sintético, incubar a 37ºC por 8 a 10 semanas, matar pelo calor, filtrar em Seitz, concentrar pela ultrafiltração em baixa temperatura, lavar o filtrado com água destilada estéril, precipitar pelo ácido tricloracético e desidratar com éter anidrico.

O método descrito por Green consiste em se fazer as culturas em caldo sintético, incubar a 37ºC por 8 a 10 semanas, matar pelo calor, clarificar o caldo, precipitar pelo ácido tricloracético em concentração final de 4%. Lavar o sedimento com ácido tricloracético a 1% e a seguir com fosfato monopotássico a 0,3%, centrifugando a 2000 r.p.m. durante 30 minutos. Dissolver o precipitado com solução M/15 de fosfato bissódico. Remover matérias estranhas pela ultracentrifugação. Precipitar pelo ácido metafosfórico, pelo sulfato de amônio e pelo ácido tricloracético. Lavar o precipitado com água destilada estéril, duas vêzes com acetona anidrica e mais duas vêzes com éter anidrico. Dessecar no vácuo.

Estudadas estas duas fórmulas preferimos por conveniência técnica, a de Green com a qual trabalhamos.

Nosso trabalho teve não só o interesse de fabrico do PPD e da sua estandardização, mas também a preparação de PPD com amostras diferentes; assim trabalhamos com as amostras com as quais produzimos a tuberculina bruta (Ratti, Vallée e Portador I) e por outro lado com a amostra Moreau, com a qual se prepara a vacina B.C.G.

Podemos informar que na fase de preparo da tuberculina PPD para as duas modalidades, tivemos para o B.C.G. um crescimento mais retardado em relação às outras amostras.

Na fase final porém, com 12 semanas de crescimento as culturas se mostraram semelhantes em aspecto.

No final da purificação tivemos pràticamente o mesmo rendimento para as duas modalidades, isto é, cêrca de uma grama de pó para cada 10 litros de caldo de cultura.

A estandardização foi feita de acôrdo com a norma estabelecida, isto é,

em relação com o padrão internacional de referência, a PPD-S (Rt 23 com 0,05% de "Tween 80" diluida no L.C.T., S.N.T., S.E.S.P. — Rio de Janeiro, da qual 0,1 ml = 1 U. T.

A aferição da unidade foi de acôrdo também com as referências de padronização, isto é, foi utilizado 0,1 ml da diluição 1/10.000 de 2 mg de pó sêco e como diluente foi usado a solução tampão isotônica com "Tween 80".

As provas foram realizadas em cobaias inoculadas três mêses antes, com 2 mg por via sub-cutânea da amostra H 37 Rv, portanto bastante sensibilizadas.

Cada animal foi testado em sua alergia com três inoculações das diferentes tuberculinas a saber: Padrão Internacional, PPD de BCG e PPD misto das amostras Ratti, Portador I (humanas) e Vallée (bovina).

O quadro abaixo mostra que as três tuberculinas têm uma potência pràticamente igual pois os diâmetros médios das reações são bastante comparáveis.

Interessante sob o ponto de vista técnico é que a unidade aferida ao Padrão Internacional apresentou igualdade de pêso do pó sêco para as três tuberculinas, dentro do limite exigido pela Farmacopeia, isto é, 2 mg/ml.

Êstes resultados indicam que a tuberculina de BCG é tão sensível quanto a tuberculina mista para os testes em cobaios tuberculosos.

5 cobaias inoculadas com **M. tuberculosis** (H 37 Rv) — 2 mg — via sub-cutânea

Cobaia n.º	Tuberculina Rt 23 0,1 ml = U. I.		Tuberculina Tbc 0,1 ml de 1/10.000		Tuberculina de B. C. G. 0,1 ml de 1/10.000	
	24 hs.	48 hs.	24 hs.	48 hs.	24 hs.	48 hs.
17	21 x 20 +	21 x 17 +	17 x 16 +	17 x 17 +	18 x 18 +	18 x 18 +
18	24 x 16	18 x 20 +	20 x 16	17 x 18 +	19 x 16	16 x 15 +
22	20 x 19	22 x 22 +	21 x 20	23 x 22 +	18 x 18	20 x 21 +
1324	20 x 19	17 x 17 +	15 x 15 +	11 x 12 +	16 x 15 +	14 x 14 +
1393	17 x 13	16 x 13 +	24 x 18 +	20 x 18 +	21 x 17	21 x 18 +
Diâmetro médio	18,9	18,7	18,2	17,5	17,6	17,5

\+ Escara

As medidas dos diâmetros foram feitas em milímetros.

ESTANDARDIZAÇÃO DE TUBERCULINAS BRUTAS AO PADRÃO INTERNACIONAL

7 cobaios inoculados com H 37 Rv — 2 mg — via sub-cutânea						
Cobaio n.º	Tuber Padrão(2 U.T.) culina		Tuberculina B.C.G.		Tuberculina 3-61	
	0,1 ml de 1/5.000		0,1 ml de 1/20.000		0,1 ml de 1/10.000	
	24 hs.	48 hs.	24 hs.	48 hs.	24 hs.	48 hs.
49	20 x 17	18 x 17	20 x 17	21 x 20	20 x 20	20 x 17
46	23 x 20	15 x 15	18 x 20	14 x 17	18 x 18	12 x 8
50	17 x 17	15 x 16	15 x 15	12 x 12	14 x 14	11 x 13
378	17 x 16	10 x 10	17 x 15	11 x 10	13 x 11	10 x 10
1357	26 x 17	12 x 12	20 x 17	11 x 12	13 x 11	10 x 10
362	22 x 20	20 x 16	16 x 15	13 x 12	22 x 17	20 x 18
780	16 x 16	10 x 11	21 x 21	14 x 13	20 x 18	12 x 15
Diâmetro médio	18,857	14,071	17,647	13,714	16,357	13,285

Referências

Bull. Org. Mond. Santé, 1958 — **19**: 759-951.

Seibert, F. B. & Glenn, J. T. — Amer. Rev. Tuberc. — 1941 - **44**: 9.

Green, H. H. — Vet. Jour. — 1946 — **102**. 2. 267.

Resumo: Foram estudadas as técnicas de purificação de tuberculinas, e verificados os resultados, nas provas alérgicas do P.P.D. preparado com a mistura de amostras de tuberculose bovina e humana e com a amostra Moreau, com a qual se fabrica a vacina B.C.G.

Os resultados foram satisfatórios sendo as unidades concordantes.

Reprinted from: Ciencia e Cultura, 12: 175-176, 1960

NOVO MÉTODO DE SEPARAÇÃO DO ENZIMA COAGULANTE DO VENENO DE **BOTHROPS JARARACA** *

Olga B. Henriques, Mina Fichman ** e **Maria Cecília Ferraz de Oliveira**

Henriques, Fichman e Henriques (1960) estudaram um método de purificação do enzima coagulante dêste veneno que consiste em fracioná-lo por precipitação com sulfato de amônio e submeter a fração mais ativa a eletroforese em coluna de amido. O método aqui estudado é mais simples e mais rendoso. O veneno dissolvido em tampão de cacodilato 0.05 M, pH 6,2 é diretamente passado numa coluna de dietilaminoetilcelulose (DEAE) equilibrada com o mesmo tampão. Parte do material protêico não é adsorvido ficando retido porém o enzima coagulante. Proteínas inativas são eluídas com tampão de cacodilato 0.1 M, pH 6,2 e a fração coagulante é eluída com tampão cacodilato 0.2 M, pH 6,8; o restante de proteína retido é eluído com cacodilato 0.4 M, pH 7,0. A cromatografia do veneno pela coluna de DEAE purifica o enzima coagulante, tornando-o 4 vêzes mais ativo que no veneno inicial. Uma recromatografia nas mesmas condições multpilica a atividade da fração por 2 tornando-o portanto 8 vêzes mais ativo que o veneno inicial. A preparação dêste enzima que é bastante ativa pois 1 μg da mesma coagula 0.2 ml de plasma em 30 segundos é, porém ainda contaminada de Bothrops protease A e de l-aminoácido-oxidase. **(Lab. Bioquím., Inst. Butantã).**

REFERÊNCIA

HENRIQUES, O., M. FICHMAN & S. B. HENRIQUES, Biochem. J. 75: 551, 1960.

Reprinted from : ACTA PHYSIOLOGIA LATINAMERICANA, 11 : 229, 1961

Aspectos quantitativos do metabolismo protéico no rato. A. A. C. Lavras, S. B. Henriqus, E. P. Camargo y O. B. Henriques.

Após a injeção de glicina radioativa a ratos foram isolados dos fígados dos mesmos a glicina livre, a glutationa, as proteínas microssômicas solúveis em desoxicolato (DOCS), as proteínas microssômicas insolúveis em desoxicolato (DOCI), bem como as proteínas solúveis do citoplasma das células hepáticas (PC). Por meio da técnica de Work e Campbell isolou-se a dinitrofenil-glicina proveniente da glicina hepática livre e também as dinitrofenil-glicinas obtidas por hidrólise da glutationa hepática, de DOCS, de DOCI e de PC, e determinou-se a radiatividade de tôdas as amostras.

Considerando,se válida a equação de Zilversmit-Entenman, a análise matemática dos resultados revelou que se pode aceitar a glicina livre como precursor imediato das glicinas presentes na glutationa e nas frações protêicas DOCS, DOCI e PC, ao passo que se pode excluir a glicina glutatiônica como precursora imediata da glicina contida nas mencionadas frações protêicas.

A comparação das atividades específicas das glicinas de DOCS e DOCI (ribonucleoproteínas) indica, mesmo sem o auxílio de análise matemática, que os metabolismos de ambas são independentes, não sendo os resultados obtidos compatíveis com a hipótese de ser a fração microssômica DOCI precursora da fração DOCS. Admitida, porém, a validez da equação de Zilversmit-Entenman, os resultados obtidos não são compatíveis com a hipótese de ser DOCS precursor das proteínas solúveis do citoplasma e não permiten rejeitar DOCI como precursora de PC.

Reprinted from: PROCEEDINGS OF THE VIII TH INTERNATIONAL CONGRESS OF HEMATOLOGY (Tokyo, September 4-10, 1960), Vol. 3, Pan-Pacific Press, Tokyo, 1962, pp. 1855-1856.

682

Thrombophilometry

—A New Method for Investigation of Blood Coagulation "in Vivo"—

G. ROSENFELD*

A polyethylene canula is introduced in a vein or artery and its other extremity is directly connected to a recording, "fluxometer", a new apparatus constructed by ROSENFELD and RZEPPA. The blood flow, without any contact with air or any other surface but the polyethylene tube or liquid parafin, is automatically registered in a strip of paper.

The number of drops in each minute is counted, or for each regular number of drops the length of the paper is measured. As the drops are all of the same volume and the motion of the paper is regular, a relationship of the outflow of blood with the time elapsed is obtained in both ways.

Plotting the number of drops as ordinate and the time in minutes or the length in cm. as abcissa on a log-log paper, a straight line is obtained. Measuring in mm. the length of y and x, the slope of the curve is obtained as a number by dividing y/x, and this function has been named Index Thrombophilometric (I.T.), representing thus the whole measured phenomenon as a single number. When a blood is incoagulable the I.T. is theoretically 1.0, and it decreases when the clotting phenomenon is shortened.

Experiments had shown that a normal anesthetized dog has an I.T. of about

* *Laboratory of Hematology, Instituto Butantan, S. Paulo, Brazil.*

0.75. Heparin increases the I.T. to 0.93 or more, and it is also increased by treatment with dicumarol. The injection of toluidine blue in heparinized animals diminished the I.T.

The I.T. is different from the coagulation time "in vitro", it seems they do not have direct relationship, since I.T. was increased in dicumarol treated dogs in which the coagulation time did not show any changes. Probably the I.T. shows the tendency to "*in vivo*" thrombus formation in the lumen of the canula and not the clotting time as it is shown by the usual "in vitro" methods.

Reprinted from: ACTA PHYSIOLOGIA LATINAMERICANA
11 : 273, 1961

Inhibition of the Shwartzman reaction by antagonists of histamine and serotonin *. G. ROSENFELD. *(Labor. Hematologia, Instituto Butantan, São Paulo, Brasil).*

The thrombo-hemorrhagic lesion, characteristic to the local Shwartzman reaction induced in rabbits by injecting toxin of *Serratia marcescens*, was completely inhibited when antihistaminic derivatives from Phenothiazine as Fenergan, Ampliactil and Neozine were injected intradermically at the sensitized place. The intravenous injection of the same substances inhibited the reaction only in some of the animals. Serotonin antagonists like LSD, BOL and UML also prevented the reaction in some of the animals when injected intradermically. All injections were given 15 minutes before the provoking dose of toxin.

Since antihistaminics also have an antiserotonin activity, there is a confirmation of the function of serotonin in the production of the local lesion of the Shwartzman reaction; however the participation of histamine cannot be eliminated.

---

* This work was aided by a grant of the "Fundo de Pesquizas do Instituto Butantan".

Reprinted from: Ciencia e Cultura, 13: 200-201, 1961

NEUTRALIZAÇÃO IN VIVO DA AÇÃO ANTICOAGULANTE DA HEPARINA PELO VENENO BOTRÓPICO

G. Rosenfeld, L. F. Martins e R. Grecchi

Já foi verificado por Rosenfeld e Cillo (1956) que a fração coagulante do veneno **Bothrops jararaca** assim como o veneno total, é capaz de neutralizar a ação anticoagulante da heparina "in vitro", chegando a agir na proporção de 1 parte de veneno para 10.000 de heparina. Experiências "in vivo" já foram feitas no sentido de verificar se a heparina neutralizava as diversas atividades de venenos ofídicos. O objetivo atual foi estudar se "in vivo" havia também capacidade da fração coagulante de veneno de **B. jararaca,** de neutralizar a inibição da coagulação provocada pela heparina.

Cães normais anestesiados foram injetados intravenosamente com 3,5 mg/K de heparina. Essa dose provocou grande prolongamento de tempo de coagulação até 90 minutos depois e retôrno ao normal após 3 1/2 horas. A fração coagulante do veneno de **B. jararaca** injetada intravenosamente 5 minutos depois da heparina na proporção de 1/10 em relação a heparina produziu uma nítida neutralização da incoagulabilidade encurtando os tempos de coagulação. Proporções de 1/5 e 1/20 ainda mostraram a mesma atividade em menor grau.

Na proporção de parte iguais em pêso de heparina e fração coagulante houve ação negativa pela desfibrinação do sangue.

(Lab. Hematologia, Inst. Butantã, Depto. Histologia e Embriologia e Depto. Anatomia Patológica, Fac. Med. Vet., U.S.P.).

Reprinted from: Ciencia e Cultura, 13 : 291, 1961

TEMPO DE RECALCIFICAÇÃO EM PLASMA DE CAVALO, CONSERVADO E DILUÍDO

Gastão Rosenfeld, Jenny Orso * e Anita Wanjtal **

O tempo de recalcificação em plasma conservado a 5°C aumentou lentamente até o quinto dia e daí em diante ràpidamente, ultrapassando 24 horas depois de 10 dias. Plasma conservado diluído a 20% com salina deu tempo de recalcificação mais curto do que o mesmo plasma não diluído. O tempo de recalcificação em plasma diluído com plasma armazenado de tempo de coagulação longo. As diluições foram feitas de 10 em 10% até 50% e daí em diante de 5 em 5%. As diluições até 50% não tiveram influência no tempo de recalcificação. Abaixo de 50% houve um gradual prolongamento.

O mecanismo dessas modificações não é bem explicável pelos conhecimentos clássicos. **(Lab. de Hematologia, Inst. Butantã, São Paulo, Brasil).**

(*) Bolsista da CAPES.

(**) Bolsista do Conselho Nacional de Pesquisas.

Reprinted from: Ciencia e Cultura, 12 : 111, 1960

ESTUDOS DE HEMOGLOBINAS A, S, D E F EM DUAS FAMÍLIAS DA RAÇA BRANCA COM ANEMIA DREPANOCÍTICA (FALCIFORME)

G. Rosenfeld e H. Rzeppa

Duas famílias de raça branca com casos de anemia drepanocítica (falciforme), foram examinadas hematològicamente. De alguns dêsses indivíduos foram identificados as hemoglobinas pelos métodos de Itano e Singer além de análise eletroforética.

Uma das famílias era de origem siciliana tanto do lado materno como paterno. Na primeira geração o avô paterno era portador de drepanocitemia, caráter êste transmitido a um dos 9 filhos que por sua vez teve dois filhos, um filho com anemia drepanocítica e uma filha com drepanocitemia. Do lado materno, nada havia. Foram identificados as seguintes hemoglobinas: Pai 56,8% de A + 43,2% de S; Mãe 100% de A; Filho 86,6% de S + 13,4% de F; Filha 62,2% de A + 37,8% de S.

A segunda famílìa era originária do interior da Paraíba e Pernambuco (Brasil). O pai nada apresentava, a mãe clìnicamente normal era portadora de drepanocitemia e o único filho sofria de anemia drepanocítica. As hemoglobinas encontradas foram as seguintes: Pai 48,7% de A + 51,3% de D; Mãe 55,7% de A + 44,3% de S e filho com 43,3% de A + 57,7% de S. **(Lab. Hematologia, Inst. Butantã, São Paulo).**

●

Reprinted from: ACTA PHYSIOLOGICA LATINOAMERICANA (Proceedings) 11: 233-234, 1961

Identification of enzyme, in ophidian venoms, responsible for ADP dephosphorylation. S. SCHENBERG AND F. A. PEREIRA LIMA. *(Secc. Fisiología, Instituto Butantan, São Paulo. Brasil).*

The enzymic process by means of which ophidian venoms dephosphorylate ADP is not yet well established. E. A. Zeller (1) states that ATP and ADP are both actuated by ophio-ATPase. M. Johnson *et al.* (2) suggest the existence of an ADPase in *Naia naia* venom.

Brazilian snake venoms have small ADPase activity, however, their ATPase activity is relatively strong. The study of both enzymes in these venoms presents some difficulties due to their similar characteristics and low ADPase activity.

Other investigations showed that single snake venoms may not contain one or more of the components found in their species venom pool (3, 4). Based on these observations and trying to simplify the analytic part, individual venoms from several species were investigated with the finality to find venoms which would only present ADPase activity being, however, deprived of ophio-ATPase; this was attained with single venoms of *Bothrops cotiara* species.

This finding, by itself, was sufficient to confirm the existence of two distinct enzymic processes responsible for ATP and ADP dephosphorylation. With these venoms it was also observed that the ADPase activity presents some characteristics, Co^{++}, constituting its best activator, increasing ADP dephosphorylation in about 10 times, this ion activates to a lesser degree ophio-ATPase from these venoms.

The low ADPase activity of these venoms turned uninteresting their study. Another more active venom was then searched and this of *Bitis gabonica* showed to be well fitted for this investigation as it strongly dephosphorylates AMP (5-nucleotidase), ATP (ophio-ATPase) and ADP (ADPase activity), allowing a better comparative study of these phosphatases.

Characteristics of "Bitis gabonica" activity. The substrates and their degradation products were separated by paper chromatography and estimated by ultra-violet light in a Beckman spectrophotometer. In diluted solutions, at room temperature, this venom looses, in the first hour, about 70 % of its ADPase activity. The determinations were made with solutions containing 10-30 μg/ml of venom. Incubations were made with glycine buffer pH 8.8, during 15 minutes, in a waterbath at 37° C.

Activation. Co^{++}, Mg^{++}, Mn^{++} and Ni^{++} are activators. Co^{++} in 4 mM concentration is its outstanding activator, increasing about 27 times (2700 %) its ADPase activity.

Inactivation. Zn^{++}, Cd^{++}, cysteine and glutathione are inactivators. Cysteine is the best inactivator, cystine and oxidized glutathione are both inactive, this suggests the possibility of SH groups to be involved in the enzymic process.

Differences between ADPase activity and ATPase from "Bitis gabonica" venom. 1) Considering venom weight, ADPase activity is much stronger than ATPase; 2) Co^{++} activates much more the ADPase activity than ATPase; 3) Mg^{++} activates less ADPase activity than Co^{++}, both these ions activate equivalently ATPase; 4) Zn^{++} inhibits ADPase activity and is one of the best ATPase activators; 5) $\alpha\,\alpha'$ dipyridyl is indifferent for ADPase activity but strongly inhibits ATPase; 6) ADPase activity is found in venoms deprived of ophio-ATPase.

Thiamine pyro and orthophosphates are not substrates for ADPase activity, this seems to show some specificity for ADP, meanwhile, as this enzyme characteristics are not well established, it was provisorily termed by its activity (ADPase activity); further investigations will confirm if it can really be considered as a true ADPase.

(1) ZELLER, E. A.: *The Enzymes*, vol. 1 (1951), Ed. by Sumner, J. B. & Myrbäck, K. New York: Academic Press Inc.

(2) JOHNSON, M., KAYE, M. A. G., HEMS, R. AND KREBS, H. A.: *Biochem. J.*, 1953, *54*, 625.

(3) SCHENBERG, S.: *Science*, 1959, *129*, 1361.

(4) SCHENBERRG, S.: *to be published.*

Reprinted from : Ciencia e Cultura, 13 : 187-188, 1961

ESTUDO COMPARATIVO DA DESFOSFORAÇÃO DO ADP POR VENENOS OFÍDICOS

S. Schenberg e F. A. Pereira Lima*

Apesar de ser conhecido que os venenos ofídicos incubados com ADP libertam fósforo dêste nucleótide, não tinha ainda sido positivada a existência de uma enzima, nos venenos ofídicos, à qual pudesse ser atribuída especificidade para esta atividade ADPásica. Ùltimamente foi possível demonstrar, com veneno de **Bitis gabonica**, que os venenos ofídicos possuem uma enzima que atua especìficamente sôbre o ADP sendo bioquìmicamente diferenciável da Ofio adenosinatrifosfatase que atua especìficamente sôbre o ATP (1).

No presente trabalho procura-se comparar as características dessa atividade ADPásica em venenos de várias espécies ofídicas brasileiras e de uma única africana (**Bitis gabonica**).

Os resultados a serem comunicados mostram que existem diferenças bioquímicas qualitativas e quantitativas na atividade ADPásica dos venenos das várias espécies.

Imunològicamente também são observadas diferenças na atividade ADPásica dos venenos estudados.

A presente investigação ainda se encontra em sua fase preliminar, mesmo assim, os dados já obtidos parecem indicar que as moléculas responsáveis pela ação ADPásica dos diferentes venenos parecem possuir estrutura diferente. (**Secção de Fisiol., Inst. Butantã, C. P. 65, São Paulo, Brasil**).

(*) Bolsista do F. Pq. do I. But.

Reprinted from: Ciencia e Cultura, 13: 188-189, 1961

CARACTERISTICAS DA OFIO ADENOSINATRIFOSFATASE DOS VENENOS DE BOTHROPS JARARACA, CROTALUS DURISSUS TERRIFICUS E BITIS GABONICA

S. Schenberg e F. A. Pereira Lima *

Em comunicação anterior (1) foram apresentados alguns resultados de nossas investigações referentes à Ofio adenosinatrifosfatase dos venenos de jararaca e cascavel. Os dados bioquímicos que encontramos diferiam dos descritos nas várias publicações referentes a essa enzima. Uma parte das discrepâncias decorria do fato de determinar-se indiretamente o fósforo liberado no processo enzímico através de outra enzima (5-Nucleotidase) também presente nos venenos ofídicos. Na realidade algumas das características descritas para a Ofio adenosinatrifosfatase não correspondiam a essa enzima e sim à 5-Nucleotidase.

Outras diferenças não podiam, entretanto, ser explicadas por deficiências técnicas, tudo indicava que as moléculas de Ofio adenosinatrifosfatase dos vários venenos deveriam diferir também quanto a suas estruturas moleculares.

A Ofio adenosinatrifosfatase foi descoberta por E. A. Zeller. Suas publicações baseiam-se fundamentalmente em observações feitas com veneno de **Bitis gabonica**. Zeller descreve êste veneno como sendo o mais ativo quando sua atividade ATPásica é determinada em presença do Mg^{++}, razão pela qual foi escolhido êsse veneno africano para a comparação de sua atividade ATPásica com a mesma atividade de dois venenos ofídicos brasileiros.

O presente trabalho consiste no estudo bioquímico e imunológico do desdobramento do ATP pela Ofio adenosinatrifosfatase dos venenos botrópico (**B. jararaca**), crotálico e gabônico.

Os resultados obtidos mostram que a atividade ATPásica dêsses venenos parece depender de enzimas que se diferenciam quanto a suas estruturas moleculares.

Os dados bioquímicos indicam que os próprios centros enzímicos da Ofio adenosinatrifosfatase diferem em sua estrutura molecular de veneno para veneno. As diferenças são mais acentuadas quando a comparação é feita entre os venenos brasileiros e o africano (**B. gabonica**), sendo menores entre os de jararaca e cascavel. (**Secção de Fisiologia, Inst. Butantã, São Paulo, C. P. 65, Brasil**).

---

(1) Schenberg, S. e Pereira Lima, F. A. Comunicação apresentada na XII Reunião Anual da SBPC de Piracicaba.

(*) Bolsista do Fundo de Pesqusas do Instituto Butantã. O presente trabalho foi realizado com auxílio do FPIB.

Reprinted from: Ciencia e Cultura, 13: 188, 1961

ESTUDO COMPARATIVO DA 5-NUCLEOTIDASE NOS VENENOS DE BOTHROPS JARARACA, CROTALUS DURISSUS TERRIFICUS E BITIS GABONICA

S. Schenberg, F. A. Pereira Lima* e E. Angelino*

Certas dificuldades surgidas no estudo comparativo de fosfatases dos venenos ofídicos e a falta de dados elucidativos da literatura a êsse respeito, conduziu à realização do presente trabalho.

As verificações feitas sôbre a ação dessa fosfoesterase foram de ordem bioquímica e imunológica.

Bioquìmicamente considerou-se a influência de várias substâncias no desdobramento do AMP, usado como substrato, sob a ação da 5-Nucleotidase dos 3 venenos.

Pôde-se assim observar certas diferenças qualitativas e quantitativas quanto à ação do CO++, Mg++, cistina, histamina, Zn++, Ca++ e outros, o que indicava provàvelmente diferenças de ordem molecular na enzima dos 3 venenos.

Em ensaios de neutralização cruzada com sôros anticrotálico e anti-**B. jararaca,** observou-se que cada veneno perde sua proporção normal de desdobramento do AMP quando ao processo de desfosforação dêsse substrato são juntados os dois sôros. Os venenos sofrem neutralização da sua atividade 5-Nucleotidásica mesmo em presença de sôros heterólogos o que demonstra uma possível semelhança de suas moléculas.

Os ensaios bioquímicos parecem indicar que mesmo os centros enzímicos das moléculas diferem de veneno para veneno. **(Secção de Fisiologia, Instituto Butantã, São Paulo, C. P. 65, Brasil).**

---

(1) Schenberg, S. e Pereira Lima, F. A. Trabalho em publicação, resumo do mesmo será apresentado na IV Reunião da Associação Latino-Americana de Ciências Fisiológicas.

(*) Bolsista do Fundo de Pesqusas do Instituto Butantã. O presente trabalho foi realizado com auxílio do FPIB.

Reprinted from: REVISTA BRASILEIRA DE MICROBIOLOGIA, 2 : 27, 1960

Rev. Bras. Microb., 2 (1): 27

MUTAÇÃO INDUZIDA NA SERRATIA MARCESCENS (*)

BRUNO SOERENSEN

Laboratório Bacteriologia, Instituto Butantan, São Paulo, S.P.

Recebido para publicação em 26/10/59

De cultura de escarro foi isolada uma cepa de bacilos Gram negativos cujos caracteres culturais e bioquímicos coincidem com a **Serratia marcescens.**

Experimentando-se esta amostra para a prova de sensibilidade em presença de vários antibióticos, e em particular da terramicina, se mostrou inibida em suas propriedades cromogênicas.

Partindo de uma colônia vermelha, por tentativa de repiques sucessivos em caldo + Terramicina em uma concentração ótima de 3000 mcg/ml, consegue-se selecionar culturas incolores. De uma destas culturas é isolada uma colônia absolu amente branca que em repiques sucessivos sem Terramicina não adquire mais a côr vermelha original da amostra.

Estudadas, as cepas original e a de mutação induzida foi verificado que as características culturais, bioquímicas e antigênicas, são absolutamente comparáveis entre si. De interêsse porém é ressaltar que os testes de virulência, realizados em camondongos, revelam para amostra original maior virulência que a da cultura mutante. Quanto às provas de proteção direta e cruzada foi demonstrada a proteção de uma cepa para a outra com diferenças não significativas, relacionadas naturalmente com a virulência.

O autor julga poder concluir que o estudo do comportamento cromogênico da amostra mutante revela qualidades novas pràticamente irreversíveis, sem alterar as características morfológicas, culturais, bioquímicas e antigênicas da amostra selvagem.

(*) Comunicação à Sociedade Brasileira de Microbiologia, Secção de São Paulo, em 29-9-1959.

UNIVERSITY OF ILLINOIS-URBANA
3 0112 125177532

Imprimiu - Tipografia Edanee S.A
São Paulo